

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA Y ANTROPOLOGÍA FÍSICA



TESIS DOCTORAL

Variabilidad genética y filogeografía de la trucha común *Salmo trutta* en el sur de la Península Ibérica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Shaila Leal García

Directora

Ana Almodóvar Pérez

Madrid, 2014

VARIABILIDAD GENÉTICA Y FILOGEOGRAFÍA DE LA
TRUCHA COMÚN *SALMO TRUTTA* EN EL SUR DE
LA PENÍNSULA IBÉRICA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

M^a Shaila Leal García

Bajo la dirección de la Doctora
Ana Almodóvar Pérez

Madrid, 2014

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Zoología y Antropología Física



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Zoología y Antropología Física



**VARIABILIDAD GENÉTICA Y FILOGEOGRAFÍA DE LA
TRUCHA COMÚN *SALMO TRUTTA* EN EL SUR DE LA
PENÍNSULA IBÉRICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

M^a Shaila Leal García

Bajo la dirección de la Doctora

Ana Almodóvar Pérez

Madrid, 2014

**ANA ALMODÓVAR PÉREZ, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO
DE ZOOLOGÍA Y ANTROPOLOGÍA FÍSICA DE LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID (UCM),**

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada “**VARIABILIDAD GENÉTICA Y
FILOGEOGRAFÍA DE LA TRUCHA COMÚN *SALMO TRUTTA* EN EL SUR DE LA
PENÍNSULA IBÉRICA**”, que presenta **Da. M^a Shaila Leal García** para optar al grado de
Doctor en Biología, ha sido realizada en el Departamento de Zoología y Antropología Física de
la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid bajo mi
dirección. Así mismo, autorizo su presentación a la Junta de Facultad al considerar que reúne
las condiciones científicas necesarias de un trabajo de Tesis Doctoral.

Para que así conste, firmo el presente certificado,

Madrid, Septiembre de 2014

Fdo. Ana Almodóvar Pérez

Fdo.: M^a Shaila Leal García

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía a través de la Empresa Pública EGMASA entre 2005-2007 y 2009-2010 (Proyecto NET523184/1) bajo el amparo del Art. 83 L.O.U.

AGRADECIMIENTOS

El camino que hoy acaba empezó como algo totalmente secundario hace casi diez años. Atrás han quedado mis inicios leyendo escamas con la única compañía de unas bermejuelas y los comienzos en un laboratorio que nada tiene que ver a los actuales. Sin embargo, a pesar de todas las idas y venidas y parafraseando a dos grandes amigas: “el fin se acerca”. Y sí, aunque he intentado huir de él no he sido tan rápida. Quizá mi subconsciente, con algo de ayuda externa, me ha ido frenando hasta alcanzarme. En realidad, aunque no os voy a negar que ha sido duro, no me arrepiento de lo que he hecho o conseguido durante todo el trayecto. He aprendido muchísimo, pero lo más importante, he tenido la gran suerte de encontrar a mi alrededor grandes personas que han aguantado estoicamente mis locuras, alentándome a continuar y a luchar cada día. Sin ellas, terminar esta Tesis habría sido imposible.

En primer lugar quiero dar las gracias a Ana Almodóvar, directora de esta Tesis, por depositar su confianza en mí desde el principio. Aún recuerdo perfectamente la primera reunión que tuvimos en la Universidad de Alcalá en la que me contabas tus líneas de trabajo. Quién se iba a imaginar que una bióloga de bota acabaría metida de lleno entre pipetas, cubetas y termocicladores; y encima, que disfrutaría de ello. Gracias por tu pasión contagiosa, apoyo, consejo y aliento, pero sobre todo, gracias por guiarme a través de todo este camino.

Gracias también al resto de miembros del grupo de investigación. Benigno Elvira por su gran sabiduría, sus historias y su calma en los momentos difíciles. Graciela G. Nicola por su paciencia, conocimiento y experiencia, siempre dispuesta a ayudar en cualquier tarea. A Dani por todos esos buenos momentos en los que me dejabas con la boca abierta y muerta de risa. Y en especial a Irene, por ser tú y estar siempre ahí cuando te he necesitado de agenda, diccionario, mano extra, pañuelo y un infinito etcétera aún más largo que esta Tesis. En mil trabajos que haga siempre te echaré (y te echo) de menos.

Gracias a los profesores del Departamento, que con sus sustos y bromas me han hecho sentir como en casa. Pero en especial a Rosario Calderón y Dario Díaz Cosín. Nunca os podré agradecer lo suficiente vuestro apoyo y palabras de aliento durante estos años.

No me puedo olvidar de toda esa gente que ha participado de forma indirecta en esta Tesis, muchos de ellos Doctores o Doctores en ciernes y compañeros de batalla del Departamento. Horas y horas de café, comidas y cervezas han conseguido que tenga una segunda familia y amigos capaces de cualquier cosa por echar una mano.

Muchísimas gracias a todos, pero en especial al “sector becario”, sus consortes y progenie. A Bea, por estar siempre a mi lado y ayudarme, Sofi por su continua sonrisa y sus hipos, Marta por conseguir que las lombrices me parezcan hasta interesantes, Pablo por saberlo todo menos hacer una regla de tres, a Miren, porque desde que nos conocimos hace eones no consigo deshacerme de ti y siempre acabamos tomando café juntitas (ánimo, que puedes con todo y más), Iván por su paciencia a mis tomaduras de pelo constantes, Antón por sus resoplidos, abrazos y peculiar sentido del humor, Carlos, de apellido Letes, por ser el único metalero que me pone tierna y alegre a la vez, Peri, mi sexador de acebuches particular, porque siempre me haces reír y Samu porque todavía intento que te conviertas en Hulk (no pierdo la esperanza). No me olvido de Crispis, Michelangelo y Elena, Joaquín, Jasper, Mateja, Michäel,

Rita, Jaime, Guille, Javi F., Bea M., Amparo, Javi P., Elena T., Candela, Richard y todos los que han pasado por aquí estos años. Gracias por aportar vuestro granito de arena.

A mis compañeros alcalaínos y familia por todas esas horas de césped y Mus apartados del mundo. A Nat por su manera especial de ver el mundo, a Alberto por ser una de las nuestras, Guille porque eres mi cura particular, Laura rizos por sus fricadas, Gema por tener los mellizos más bonitos del mundo y Laura pinzas porque siempre nos volvemos a encontrar. Pero en especial a Ana y Miriam. Sois mi soporte, y aunque seamos tan distintas mi vida no sería lo mismo sin vosotras. Os quiero brujas.

Otra parte importante de mi vida ha sido la música y el baile. Gracias a todos esos genios del Jazz y del Metal que me han acompañado estos años. Pero sobre todo a “los guays que bailan” Silvia, Alexandra, Sari y Juanjo; y a todos los que han hecho que me divirtiera como follower y lo diera todo a tiempos de seis y ocho. Sois muchísimos y la lista sería interminable, pero mil gracias a todos.

Gracias a mi familia, pequeña pero matona, pero sobre todo a mis padres y mi hermana ya que sin ellos no sería lo que soy. A mi padre, por su sentido humor y su preocupación constante, a mi madre por su paciencia con mis locuras y apoyo, y a mi hermana porque no me imagino la vida sin ella. Además, tampoco me puedo olvidar de mi cuñado que siempre me saca una sonrisa con y sin Excel, mis sobris Emma y Léo que son la cosa más bonita del mundo, de mis yayos, tíos y primos carnales y postizos. Sois la mejor familia del mundo.

Finalmente, y no menos importante a mi alma gemela, Luis. Gracias por ayudarme, por entenderme con solo mirarme, por animarme, cuidarme y quererme hasta el infinito y más allá. Sin ti esto no hubiera sido posible (o quizá sí, pero mucho más aburrido). Te quiero bicho.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS.

A Luis

A mis padres

A mi hermana

Estación transparente resuelta en luz y herida.

*Lento espacio sin voz
abriéndose a la tierra.*

*Canción hasta el dolor, sueño de cal:
ardiendo
qué hilo no nos separa de la nada.*

Umbilical (Ana Gorría)

ÍNDICE

Summary.....	7
I. Introducción general.....	13
I.1. Aspectos generales.....	15
I.2. Especie de estudio: la Trucha Común.....	18
I.3. Área de estudio.....	24
II. Objetivos.....	27
III. Introgresión genética de la Trucha Común <i>Salmo trutta</i> en el sur de la Península Ibérica.....	31
III.1. Introducción.....	33
III.2. Material y métodos	
III.2.1. Recogida de muestras.....	35
III.2.2. Análisis de laboratorio	
III.2.2.1. Extracción de ADN.....	35
III.2.2.2. Amplificación y genotipado del locus <i>LDH-CI</i> *.....	36
III.2.2.3. Amplificación y genotipado de loci microsatélites....	38
III.2.3. Análisis de datos	
III.2.3.1. Caracterización de loci microsatélites.....	39
III.2.3.2. Introgresión genética.....	40
III.3. Resultados	
III.3.1. Introgresión genética en el conjunto de las poblaciones.....	41
III.3.1.1. Introgresión genética en la cuenca del Guadalquivir..	42
III.3.1.2. Introgresión genética en las cuencas mediterráneas...	43
III.3.2. Evolución temporal de la introgresión genética.....	50
III.3.3. Comparación de marcadores genéticos aplicados al estudio de la introgresión nuclear.....	51
III.4. Discusión	
III.4.1. Introgresión genética en el conjunto de las poblaciones.....	59
III.4.2. Evolución temporal de la introgresión genética.....	62
III.4.3. Comparación de marcadores genéticos aplicados al estudio de la introgresión nuclear.....	64

IV. Diversidad y estructuración genética de la Trucha Común <i>Salmo trutta</i> en el sur de la Península Ibérica.....	67
IV.1. Introducción.....	69
IV.2. Material y métodos	
IV.2.1. Análisis de laboratorio	
IV.2.1.1. Extracción de ADN.....	71
IV.2.1.2. Amplificación y genotipado de la región control mitocondrial.....	71
IV.2.1.3. Amplificación y genotipado de loci microsatélites.....	72
IV.2.2. Análisis de datos	
IV.2.2.1. Asignación de líneas evolutivas e identificación de haplotipos.....	72
IV.2.2.2. Caracterización de loci microsatélites.....	73
IV.2.2.3. Diversidad genética intrapoblacional.....	73
IV.2.2.4. Diferenciación genética interpoblacional.....	74
IV.2.2.5. Distancia genética interpoblacional.....	76
IV.2.2.6. Aislamiento poblacional por distancia.....	77
IV.2.2.7. Historia demográfica.....	77
IV.2.2.7.1. Pruebas de neutralidad.....	78
IV.2.2.7.2. Distribución de las diferencias genéticas entre pares de poblaciones.....	79
IV.2.2.7.3. Cuellos de botella.....	80
IV.2.2.8. Migración y tamaño efectivo poblacional.....	81
IV.3. Resultados	
IV.3.1. Estructura genética poblacional en la cuenca del Guadalquivir	
IV.3.1.1. Diversidad genética intrapoblacional.....	82
IV.3.1.1.1. Diversidad genética intrapoblacional en la cuenca del Alto Guadalquivir.....	87
IV.3.1.1.2. Diversidad genética intrapoblacional en la cuenca del Guadiana Menor.....	90
IV.3.1.1.3. Diversidad genética intrapoblacional en la cuenca del Genil.....	93
IV.3.1.2. Diferenciación genética interpoblacional	
IV.3.1.2.1. Diferenciación genética interpoblacional mitocondrial.....	97

IV.3.1.2.2. Diferenciación genética interpoblacional nuclear.....	99
IV.3.1.2.2.1. Diferenciación genética interpoblacional en la cuenca del Alto Guadalquivir.....	102
IV.3.1.2.2.2. Diferenciación genética interpoblacional en la cuenca del Guadiana Menor.....	105
IV.3.1.2.2.3. Diferenciación genética interpoblacional en la cuenca del Genil.....	108
IV.3.1.3. Aislamiento poblacional por distancia.....	113
IV.3.1.4. Historia demográfica.....	114
IV.3.1.5. Migración y tamaño efectivo poblacional.....	116
IV.3.2. Estructura genética poblacional en la cuenca del Guadalfeo	
IV.3.2.1. Diversidad genética intrapoblacional.....	120
IV.3.2.2. Diferenciación genética interpoblacional	
IV.3.2.2.1. Diferenciación genética interpoblacional mitocondrial.....	125
IV.3.2.2.2. Diferenciación genética interpoblacional nuclear.....	127
IV.3.2.3. Aislamiento poblacional por distancia.....	132
IV.3.2.4. Historia demográfica.....	132
IV.3.2.5. Migración y tamaño efectivo poblacional.....	134
IV.3.3. Estructura genética poblacional en la cuenca del Segura	
IV.3.3.1. Diversidad genética intrapoblacional.....	136
IV.3.3.2. Diferenciación genética interpoblacional	
IV.3.3.2.1. Diferenciación genética interpoblacional mitocondrial.....	141
IV.3.3.2.2. Diferenciación genética interpoblacional nuclear.....	143
IV.3.3.3. Aislamiento poblacional por distancia.....	145
IV.3.3.4. Historia demográfica.....	147
IV.3.3.5. Migración y tamaño efectivo poblacional.....	149
IV.4. Discusión	
IV.4.1. Incidencia de las repoblaciones.....	151
IV.4.2. Diversidad genética intrapoblacional.....	152
IV.4.3. Estructura genética poblacional.....	155
IV.4.4. Historia demográfica.....	160

V. Filogeografía de la Trucha Común <i>Salmo trutta</i> en el suroeste europeo.....	163
V.1. Introducción.....	165
V.2. Material y Métodos	
V.2.1. Análisis de laboratorio	
V.2.1.1. Extracción de ADN.....	167
V.2.1.2. Amplificación y secuenciación de la región control mitocondrial.....	167
V.2.1.3. Amplificación y secuenciación del gen citocromo b...	167
V.2.1.4. Amplificación y secuenciación del espaciador interno ribosomal 1.....	168
V.2.1.5. Amplificación y genotipado de loci microsatélites...	168
V.2.2. Análisis de datos	
V.2.2.1. Asignación de líneas evolutivas e identificación de haplotipos.....	168
V.2.2.2. Análisis filogenéticos	
V.2.2.2.1. Análisis de los alineamientos.....	169
V.2.2.2.2. Variación y divergencia genética.....	170
V.2.2.2.3. Inferencia filogenética.....	171
V.2.2.2.4. Datación y tiempos de divergencia.....	173
V.2.2.3. Análisis filogeográficos	
V.2.2.3.1. Redes de haplotipos.....	174
V.2.2.3.2. Historia filogeográfica.....	175
V.2.2.4. Estructuración poblacional.....	176
V.3. Resultados	
V.3.1. Análisis filogenéticos	
V.3.1.1. Análisis de los alineamientos de secuencias.....	177
V.3.1.2. Variación y divergencia genética.....	178
V.3.1.3. Inferencia filogenética.....	181
V.3.1.4. Datación y tiempos de divergencia.....	182
V.3.2. Análisis filogeográficos	
V.3.2.1. Redes de haplotipos.....	187
V.3.2.2. Historia biogeográfica.....	190
V.3.3. Estructuración poblacional.....	195
V.4. Discusión.....	203
V.4.1. Variación y divergencia genética.....	203
V.4.2. Inferencia filogenética.....	204
V.4.3. La Trucha Común en el área mediterránea.....	205
V.4.3. La Trucha Común en el sur de la Península Ibérica.....	210

VI. Discusión general y conclusiones.....	215
VI.1. Discusión general.....	217
VI.2. Conclusiones.....	225
VII. Directrices de gestión y conservación.....	229
VIII. Bibliografía.....	235
IX. Anexos.....	269
IX: 1. Anexo I.....	271
IX: 2. Anexo II.....	274
IX: 3. Anexo III.....	276
IX: 4. Anexo IV.....	277
IX: 5. Anexo V.....	280
IX: 6. Anexo VI.....	283
IX: 7. Anexo VII.....	286
IX: 8. Anexo VIII.....	291

Genetic variability and phylogeography of brown trout *Salmo trutta* in the South Iberian Peninsula. M^a Shaila Leal García. Madrid, 2014.

Background

The preservation of genetic diversity is a major task in conservation and evolutionary biology, as genetic variation is the raw material for evolutionary change within a population. The Iberian Peninsula contains an ancient, isolated and highly endemic fauna, and is considered a biodiversity hotspot. Its high biodiversity is the result of geophysical, climatic, historical and ecological factors. Moreover, this region has a long history of human activity in natural ecosystems. Human impact has shaped the current landscape and its ecological features, including effects on gene flow, differentiation and local selection pressures and constraints for multiple species. In this regard, fluvial and riparian habitat have not been an exception.

The position of the Iberian Peninsula seems to be crucial for the conservation of genetic diversity of brown trout as a whole. However, this species shows a marginal distribution in the Iberian Peninsula. Its populations usually present low densities and are more prone to local extinction than in other areas of the species' range. In fact, the genetic integrity of some of these populations is currently threatened due to restocking with trout from central and northern Europe as well as to introduction of exotic species, habitat modification, environmental pollution and overfishing.

Brown trout is one of the most important European angling freshwater fish, with a high socio-economic status. In addition, this species has a large morphological, physiological and ecological variability, showing high genotypic and phenotypic diversity across populations. The geographical position of the Iberian Peninsula has played a major role in the current Palaearctic distribution of this species, and has a high conservation value due to genetic uniqueness. Iberian brown trout populations show a strong genetic differentiation both within and among drainage systems, as a result of multiple colonization events by different lineages, secondary intergradation and genetic drift. Furthermore, populations that settle in marginal habitats may be very active of natural selection, and hence of adaptive significance to this species.

Genetic data, in combination with other ecological and biological factors, may be used as the basis for conservation. Molecular markers allow us to assess and understand genetic diversity patterns present in a population. Moreover, these markers help to detect isolation, gene flow, kinship composition and to estimate effective population sizes. Furthermore, these data can be used to infer information regarding the biotic and geological evolution of a region; among others parameters. Finally, they permit the design of management guidelines that could improve the conservation of the species in the region and so long-term maintenance of the species.

Aims & Results

The main aim of this dissertation is to analyze the patterns of nuclear and mitochondrial genetic variation in resident populations of brown trout, to explore the current genetic status of wild populations and to reconstruct their evolutionary history in the south Iberian Peninsula. First of all, these data are used to assess and quantify the impact of foreign trout introductions and to analyze patterns of genetic diversity in native populations. Moreover, the resulting data are used for estimating divergence times of supported intraspecific lineages in this species, as well as to locate in time the main splitting events of the *Adriatic* and *Mediterranean* lineages. Based on the inferred history, this dissertation proposes biogeographical hypotheses to explain evolutionary diversification of brown trout within the Mediterranean area and south Iberian Peninsula. Finally, and based on information from molecular data, some management guidelines are proposed that could improve the conservation of brown trout in the south Iberian Peninsula.

Following these objectives, 2102 adipose fin clips were collected by electrofishing in 93 sampling localities in the south Iberian Peninsula, comprising 34 representative rivers from the Guadalquivir, Guadalfeo, Adra, Andarax and Segura basins. The nuclear *LDH-C1** gene and eight microsatellite loci were used to investigate the genetic introgression between native and alien brown trout. Reference samples were taken from foreign hatchery trout for comparison with the sampled populations. Genetic diversity, differentiation and demographic history within and between rivers were estimated from the mitochondrial control region (D-Loop) and eight microsatellite loci. Finally, phylogenetic relationships and divergence times were inferred using the D-Loop region, the mitochondrial cytochrome b gene (Cyt b) and the nuclear ribosomal internal transcribed spacer-1 (ITS 1). Timing of the differentiation of lineages was estimated under a Bayesian framework using a concatenated sequences data set, analyzing all the brown trout lineages together, as well as considering the *Adriatic* and *Mediterranean* lineages in separate analyses. Reference sequences for all the evolutionary lineages of the species were included in the phylogenetic analysis.

In the introgression analysis, the main results showed that 70% of the sampling locations showed introgression by genes of hatchery origin. The mean introgression estimated by the locus *LDH-C1*90* was high (20%), and more elevated than the average detected in other Iberian basins. The frequency of the exotic locus was quite variable among rivers and ranged from no foreign alleles to 100% of individuals had no-native alleles. In most cases, the results did not reflect differences between rivers within each basin. Furthermore, most introgressed populations did not show significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium, which could indicate that non-native genes were incorporated into the wild populations by random breeding with native trout. A comparison of populations between 1996 and 2009 showed that the cessation of stocking with allochthonous trout did not reduce the average introgression in

the 75% of those populations. Finally, the mean introgression estimated by microsatellite loci was lower than the results found using the allele *LDH-C1*90*. 73% of rivers showed introgression by exotic microsatellite alleles while the marker *LDH-C1** detected foreign alleles in 66% of them.

Concerning the genetic diversity, the haplotype and nucleotide diversities for the mitochondrial DNA were high. Nevertheless, the genetic diversity was not distributed uniformly among the rivers, with 83% of analyzed rivers showing a unique mitochondrial haplotype. In contrast, nuclear loci reflected higher genetic diversity than that observed for the mitochondrial region. Furthermore, some populations showed fixation of alleles and less heterozygosity whereas others had higher diversity values. Pairwise F_{ST} and R_{ST} values suggested significant differentiation between most basins and rivers, and also between some of the sampling localities, which was supported by AMOVA and STRUCTURE results. Contrasting with the mtDNA data, microsatellite analyses depicted a population structure in agreement with the hydrological pattern. At the river level, this pattern was also detected among rivers located in close geographical proximity. The statistical framework used to infer the demographic history revealed that most brown trout populations follow a model of constant size through time. Moreover, mismatch analyses supported demographic expansions for Guadalquivir basin and three rivers of Guadalfeo basin. Finally, nuclear analysis showed that most of the studied populations are isolated, characterized by a low effective population size and have experienced bottlenecks, all factors which exert a strong pressure on genetic drift.

To conclude, with regard to phylogenetic relationships, six major lineages have been detected within brown trout, distinguished by relative high posterior and bootstrap support. Nevertheless, their relationships were weakly supported and remain largely unresolved. Divergence time within species was estimated to start approximately between 21 and 11 Myr in the Miocene. Although divergences within *Adriatic* and *Mediterranean* lineages were estimated to start in the mid-late Miocene (between 16 and 6 Myr) in the occidental Mediterranean, the current diversity within each lineage seems to have a mainly Pleistocene origin. Divergence analysis showed that their present distribution has been shaped mainly by vicariant but also by dispersal events, closely related to the paleogeographic and paleoclimatic history of the Mediterranean region. These results also suggest a major extinction of *Adriatic* brown trout in the late Miocene. On the other hand, the results showed the existence of two native lineages in the south Iberian Peninsula: *Adriatic* and *Mediterranean*, with an overlap distribution in Segura and Guadalfeo basins. The *Adriatic* lineage colonized the south Iberian Peninsula before the geological accretion of the Rif-Betic Cordillera and isolation of Atlantic Ocean and Mediterranean Sea in the late Miocene. During the Pleistocene, this region was newly colonized by the *Adriatic* lineage, occupying its current distribution. The *Mediterranean* lineage was

established in the south Iberian Peninsula at the end of Messinian salinity crisis during the Pliocene-Pleistocene.

Conclusions

Management of brown trout populations can be enhanced by a proper understanding of their genetic diversity patterns. The combined use of mitochondrial and nuclear markers have proved very efficient in improving the knowledge of their genetic diversity and evolutionary history.

Firstly, molecular markers have permitted the detection of a strong level of genetic introgression by foreign trout in the wild population. In fact, allochthonous material has modified the diversity and genetic structure, homogenizing genetic material in wild populations. However, the frequency of the exotic locus is very variable among rivers and depends both on genetic and non-genetic factors specific to the locality. These non-native alleles, which are fully incorporated into the populations, show a high permanence in the long term. Because of this, the poor population recovery suggests that one decade without stocking is not enough for selection forces to reduce or eliminate the genes of hatchery trout.

Secondly, this dissertation reveals considerable levels of otherwise unknown genetic diversity in brown trout in the south Iberian Peninsula. These populations show strong evidence of genetic structure with a restricted gene flow both within and between basins and rivers. Moreover, very low effective population size and gene flow between populations suggest the existence of isolated populations, supported by natural and artificial fragmentation of habitat. These results show that each basin is composed of more than one gene pool originated by several dispersal events separated in time.

Thirdly, mitochondrial and nuclear genes provide evidence of a history of isolation and divergence resulting in the diversification of the present brown trout lineages. Although diversification within the lineages is largely concordant with the Pleistocene glaciations, several earlier events associated with the Miocene were also identified. These events, which mark the divergence between lineages, seem to be associated with geological events related to the evolution of the Mediterranean basin. On the other hand, analyses of the distribution of ancestral and derived haplotypes as well as inferences related to the biogeography of *Adriatic* and *Mediterranean* lineages have allowed the identification of the first colonization of *Adriatic* lineages in the Miocene. Moreover, dispersal patterns in the *Adriatic* and *Mediterranean* lineages in the Mediterranean area are established.

Finally, some management guidelines that could broaden the knowledge of genetic variation, gene flow and evolutionary history of brown trout populations are proposed, in order to enhance the conservation status of brown trout in the area.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. Aspectos generales

La enorme diversidad que puede observarse en la región mediterránea a todos los niveles, desde el genético al ecosistémico, es el resultado de su elevada variabilidad geográfica y climática, que a su vez es herencia de su compleja historia geológica y paleoclimática (Cuttelod *et al.* 2009, Blondel *et al.* 2010). Esta área presenta un gran número de especies endémicas, lo que la ha llevado a ser clasificada como un *hotspot* de biodiversidad. Sin embargo, en la actualidad se está produciendo una importante pérdida de hábitats, debiendo ser priorizada su conservación (Myers *et al.* 2000, Brooks *et al.* 2006). De hecho, a pesar de que representa tan solo el 1,6% de la superficie terrestre, alberga aproximadamente el 10% de las plantas vasculares y más de 1000 especies de vertebrados (Blondel *et al.* 2010), siendo la zona de reproducción e invernada de millones de aves migratorias. Esta alta biodiversidad se observa también en ecosistemas acuáticos, con un 6% de la fauna y un 17% de flora descritas (Bianchi y Morri 2000, Blondel *et al.* 2010). Además de presentar una gran riqueza de especies, el área mediterránea muestra una alta proporción de endemismos tanto de fauna (33%) como de flora terrestre (50%) y acuática (20-25%) (Bianchi y Morri 2000, Cuttelod *et al.* 2009, Blondel *et al.* 2010). Cabe destacar que la cuenca del Mediterráneo no es solo un *hotspot* de biodiversidad, sino que presenta una larga historia de integración entre los ecosistemas naturales y la activada humana, que ha modelado el paisaje de toda esta área (Rundel 1998, Blondel *et al.* 2010).

A pesar de que a nivel mundial la superficie de hábitats dulceacuícolas es muy pequeña (<1%, Gleick 1996), la biodiversidad que contienen tiene un alto valor no solo ecológico, sino también económico, cultural, estético, científico y educativo (Dudgeon *et al.* 2006). Los peces de agua dulce son especialmente interesantes debido a que, a diferencia de los vertebrados terrestres y en ausencia de intervención humana, su dispersión está confinada dentro de una red fluvial, actuando las propias cuencas o ríos como islas, lo que aporta señales de la historia y paleogeografía de los sistemas hidrológicos (Blondel *et al.* 2010). La alta diversidad de la ictiofauna continental junto con la geografía de la cuenca mediterránea hace que la distribución de especies no sea homogénea, estando dividida actualmente en 23 ecoregiones de agua dulce (Abell *et al.* 2008).

El origen y la historia de los patrones de distribución y colonización de los peces de agua dulce en el área mediterránea están actualmente en debate. Asán-Brescu (1973, 1989) postuló que muchas de las especies dulceacuícolas actuales son originarias de Asia, que penetraron a través de la actual Siberia y se expandieron por toda la cuenca mediterránea mediante procesos de captura fluvial antes de la orogenia alpina. Durante las últimas glaciaciones, las especies que ocupaban la mayor parte de la región Paleártica se extinguieron y fueron sustituidas por especies más modernas, mientras que aquellas con distribución mediterránea sobrevivieron en refugios glaciales. Sin embargo, el hecho de que la fauna dulceacuícola mediterránea se asemeje más a las especies del Centro de Europa hizo sugerir una segunda hipótesis. Durante el Mioceno, la evolución tectónica del Arco de Gibraltar provocó la elevación progresiva de toda la zona, que junto con el descenso del nivel del mar (Miller *et al.* 2005), aisló el mar Mediterráneo del océano Atlántico. Bianco (1990) sugirió que a finales del Messiniense y tras la desecación casi completa del Mediterráneo, se produjo una dispersión de

la fauna dulceacuícola del Paratetis hacia el actual mar Mediterráneo. Durante la crisis salina del Messiniense, el Mediterráneo se transformó en una serie de lagos de agua dulce ("*Lago Mare*", Hsü *et al.* 1977) que habrían facilitado la dispersión y colonización de las cuencas hidrográficas que lo rodean. Sin embargo, aunque esta fase se ha reconocido en diferentes áreas del mediterráneo oriental y occidental (Orszag-Sperber 2006), los datos geológicos parecen indicar que el régimen monzónico del norte de África tuvo una mayor influencia en el periodo lacustre de agua dulce u oligohalina que la aportación del propio Paratetis en el Mediterráneo oriental (Griffin 2002). El Mediterráneo occidental parece estar menos influido por estos eventos, por lo que Doadrio y Carmona (2003) propusieron que se habría producido una expansión de la ictiofauna dulceacuícola a través de puentes intercontinentales generados por la regresión del nivel del mar durante este periodo. Sin embargo, a pesar de los trabajos a favor (Reyjol *et al.* 2007), la fase *Lago Mare* parece demasiado reciente para explicar la especiación y dispersión de los peces de agua dulce en toda el área mediterránea (Doadrio y Carmona 2003, 2004, Robalo *et al.* 2007, Levy *et al.* 2009). Por ello, Perea *et al.* (2010) postularon que el mediterráneo fue colonizado a principios del Oligoceno a través del puente marino que ocupaba los actuales Balcanes, Anatolia e Irán. El origen de la ictiofauna mediterránea e ibérica parece ser muy antiguo, estando su alta diversidad influenciada por los procesos históricos de toda la zona. De hecho, en la Península Ibérica parece que los procesos de dispersión y colonización tuvieron lugar en diferentes periodos (Doadrio y Carmona 2003, 2004, Sanjur *et al.* 2003, Cunha *et al.* 2004, Gante *et al.* 2009, 2010, Sousa-Santos *et al.* 2014), por lo que ninguna de las hipótesis anteriormente expuestas debería ser descartada (Doadrio *et al.* 2011).

Los *hotspot* de biodiversidad terrestre no son necesariamente congruentes con los *hotspot* de biodiversidad dulceacuícola (Abell *et al.* 2008). Sin embargo, el creciente número de especies de peces endémicas encontradas en los últimos años (63, Mittermeier *et al.* 2004; 148, Smith y Darwall 2006; 253, Cuttelod *et al.* 2009) hace pensar que la diversidad de la cuenca Mediterránea sigue siendo aún desconocida (Kottelat y Freyhof 2007, Fontaine *et al.* 2012, Geiger *et al.* 2014). Además, tanto las relaciones filogenéticas y el tiempo de diferenciación, como la divergencia inter e intrapoblacional están en la actualidad parcialmente exploradas. En este sentido, el desarrollo de métodos moleculares se toma imprescindible para comprender estos procesos, así como para distinguir el papel que juegan el aislamiento, la deriva y la selección natural en la evolución de las diferencias entre las poblaciones y las especies. De hecho, la información sobre la diversidad genética es esencial, no solo para la ciencia básica, sino también para desarrollar estrategias de conservación y gestión (Hartmann y André 2012, Rolland *et al.* 2012, Abellán *et al.* 2013, Greiger *et al.* 2014). La obtención de estos datos es de especial relevancia en el caso de la ictiofauna dulceacuícola, donde el 56% de las especies endémicas se encuentran en peligro de extinción (Cuttelod *et al.* 2009), debiéndose desarrollar directrices enfocadas a la preservación de la variabilidad genética, así como detectar unidades poblacionales o especies que deban ser conservadas por sus características genéticas singulares.

El mantenimiento de la diversidad genética es primordial tanto para la preservación de las especies a largo plazo (Hilborn *et al.* 2003, Lindley *et al.* 2009, Schindler *et al.* 2010) como para garantizar la propia capacidad de los ecosistemas para soportar, adaptarse y recuperarse de las perturbaciones ambientales (Luck *et al.* 2003, Frankham 2005, Reusch *et al.* 2005). Sin

embargo, actualmente es muy difícil definir y seleccionar qué acervos genéticos son diferentes y cuáles es necesario conservar. Por ejemplo, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (*International Union of Conservation of Nature*, IUCN) clasifica las especies según su peligro de extinción, teniendo en cuenta la variación intrapoblacional a la hora de asignar su categoría de amenaza. Sin embargo, los marcadores genéticos han detectado una elevada diferenciación genética interpoblacional en numerosas especies, que deberían ser consideradas como unidades de gestión y conservación (Ryder 1986). La aplicación de técnicas moleculares a la biología de la conservación ha permitido profundizar y definir Unidades con Significación Evolutiva (*Evolutionarily Significant Units*, ESUSs, Waples 1991), lo que ha hecho posible la caracterización de aquellas unidades prioritarias de conservación que incorporen la diversidad y el potencial evolutivo existente dentro de las especies. Posteriormente, Doadrio *et al.* (1996a) establecieron el término Unidades Operativas de Conservación (*Operational Conservation Units*, OCUs), definido como un área limitada por barreras geográficas donde habitan una o más poblaciones que comparten el mismo patrimonio genético. La definición de este término fue ampliada posteriormente por Dodson *et al.* (1998), añadiendo a la información puramente biológica aspectos sociales, éticos, legales y económicos.

La sobreexplotación de los recursos naturales debida a la expansión humana ha aumentado drásticamente las probabilidades de extinción de numerosas especies en todo el globo. Esto ha generado un gran esfuerzo internacional para tratar de reducir la velocidad de las extinciones, o incluso para revertir esta tendencia (entre otros: Cumbre de la Tierra de Río de Janeiro 1992, Cumbre de la Tierra de Johannesburgo 2002), así como un creciente reconocimiento de que los esfuerzos deben centrarse en el mantenimiento de la diversidad genética (Fraser y Bernatchez 2001). En este sentido, los programas de conservación y manejo de una especie deben tener en cuenta la diversidad genética en cada nivel jerárquico (Kenchington *et al.* 2003), lo que requiere una investigación detallada que permita definir los límites geográficos e identificar los mecanismos evolutivos que están actuando sobre la especie de estudio. Esta Tesis Doctoral se basa en estas premisas, centrándose en la diversidad genética de la Trucha Común (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) en el sur de la Península Ibérica, especie que está experimentando un rápido declive debido a la sobrepesca, la alteración del hábitat y las reintroducciones de linajes foráneos (entre otros: Almodóvar y Nicola 1999, García Marín *et al.* 1999a, Almodóvar 2002, Almodóvar *et al.* 2002, 2006, Sanz *et al.* 2006, Hórreo *et al.* 2011, Vera *et al.* 2013). Para ello se profundiza en el conocimiento de la variabilidad genética que presenta la especie tanto a nivel intra e interpoblacional dentro de esta área, como a nivel filogeográfico regional y europeo. Asimismo, se estudian los posibles efectos de los programas de repoblación sobre la diversidad genética en estos sistemas fluviales. De esta manera, se pretende definir y entender la variación genética a nivel poblacional, con el objetivo de utilizar esta información en la gestión y conservación de la especie.

I.2. Especie de estudio: la Trucha Común

La Trucha Común *Salmo trutta* Linnaeus, 1758, perteneciente a la familia de los Salmónidos, es una de las especies más comunes en las aguas continentales europeas presentando un alto valor tanto económico, como social y ecológico. Según Lelek (1987), la Trucha Común reside de forma natural en los ríos de Europa, norte de África y Próximo Oriente. El límite septentrional de su área de distribución nativa se encuentra en Islandia, norte de Escandinavia y Rusia. La costa norte del Mediterráneo, las islas de Córcega, Cerdeña y Sicilia, así como las montañas del Atlas en el norte de África constituyen su límite meridional. La costa europea delimita su distribución occidental, situando su límite oriental en los Urales, el mar Caspio y la cabecera del río Orontes en Líbano (Almodóvar 2002). Actualmente, la Trucha Común presenta una distribución cosmopolita (Elliot 1994, Eschmeyer 2010), debido a las numerosas introducciones producidas a lo largo de todo el mundo. Esta amplia distribución ha sido favorecida por su alta variabilidad morfológica, fisiológica y ecológica (Jonsson y Jonsson 2011), asociada fundamentalmente con su elevada plasticidad para adoptar diferentes patrones de crecimiento y reproductivos (Almodóvar 1999, Nicola y Almodóvar 2002, 2004, Parra *et al.* 2009, 2014).

Dentro de la Península Ibérica, esta especie se encuentra distribuida de manera natural por las cabeceras de todos los cursos fluviales, exceptuando algunos ríos del Levante y sur de España y cuenca del Guadiana (Doadrio 2002, Doadrio *et al.* 2011). Debido a su papel como refugio glacial, la Península Ibérica está considerada como un *hotspot* para la biodiversidad, lo que en el caso de la Trucha Común se manifiesta en una fuerte diferenciación genética a nivel poblacional (Machordom *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001, Presa *et al.* 2002, Sanz *et al.* 2002, 2011, Cortey *et al.* 2004, 2009, Vera *et al.* 2013). Además, las poblaciones que habitan los ríos ibéricos se sitúan en el límite meridional de la distribución geográfica de la especie, y las variedades que las habitan pueden constituir en muchas ocasiones adaptaciones locales particulares dentro de su umbral de tolerancia. Estas poblaciones periféricas generalmente presentan densidades poblacionales bajas, siendo por ello más propensas a la extinción local y más vulnerables a los impactos antropogénicos y a los efectos del cambio climático (Hampe y Petit 2005, Nicola *et al.* 2008, 2009, Almodóvar *et al.* 2012).

Debido a su amplia distribución paleártica, la Trucha Común está actualmente clasificada como “Preocupación Menor” (*Least Concern*, LC) por la IUCN (Freyhof 2013). Sin embargo, la sobrepesca, las introducciones de truchas alóctonas y de especies exóticas, junto con la degradación y fragmentación del hábitat la hacen especialmente vulnerable, sobre todo en los países mediterráneos. En España, las poblaciones autóctonas de Trucha Común han disminuido más de un 20% (Doadrio 2002), estando actualmente en regresión (Doadrio *et al.* 2011). Este hecho ha llevado a Doadrio (2002) a clasificar a la Trucha Común como “Vulnerable” (VU 1cde) de acuerdo con las categorías de la IUCN. Sin embargo, a nivel nacional, tanto la “Ley del Patrimonio Natural y la Biodiversidad” (Ley 42/2007) como el Catálogo Nacional de especies amenazadas (Real Decreto 139/2011 y Orden AAA/75/2012) no incluyen a esta especie en ninguno de sus anexos. En el sur de la Península Ibérica su regresión es más acusada, siendo clasificada como “En Peligro” de extinción (EN A1e) en el Libro Rojo

de los Vertebrados Amenazados de Andalucía (Franco y Rodríguez 2001). Por ello, se revela necesario el establecimiento de bases científicas para una gestión adecuada de la especie, erigiéndose como objetivo prioritario el estudio genético de sus poblaciones.

La alta variabilidad fenotípica y genética que presenta la Trucha Común ha generado un continuo debate sobre su estatus sistemático, sin que se haya alcanzado actualmente un consenso acerca de si deben considerarse especies, subespecies o poblaciones diferenciadas (Lelek 1987, Kottelat 1997, Kottelat y Freyhof 2007). Según las diferentes estrategias de vida que presenta, a lo largo del siglo XX fue clasificada en tres subespecies: *S. trutta trutta* (forma anádroma), *S. trutta lacustris* (forma lacustre) y *S. trutta fario* (forma residente). Sin embargo, esta clasificación no se apoya en los resultados filogenéticos (Ryman 1983, Hindar *et al.* 1991, Cross *et al.* 1992). Por otro lado, Kottelat (1997) y Kottelat y Freyhof (2007), teniendo en cuenta también los datos genéticos, propusieron 27 especies diferentes en Europa e indicaron que probablemente la lista está incompleta, mientras que Webb *et al.* (2007) solo reconocieron una única especie. Debido a esta confusión taxonómica, numerosos autores incluyen todas las formas descritas para la Trucha Común dentro del complejo de especies *S. trutta* (entre otros: Bernatchez 2001, Meraner *et al.* 2007, Schöffmann *et al.* 2007, Caputo *et al.* 2009, Vera *et al.* 2013).

La Trucha Común habita principalmente aguas frías y bien oxigenadas (Almodóvar 2002, Doadrio *et al.* 2011). Sin embargo, los ecosistemas dulceacuícolas no son hábitats homogéneos, por lo que la elevada variabilidad que presenta la especie a todos los niveles la dota de una elevada plasticidad para adaptarse a un amplio rango de condiciones ambientales (Jonsson y Jonsson 2011). A nivel morfológico, los patrones encontrados varían según el hábitat, observándose variaciones tanto en el tamaño y forma corporal, como en la longitud de la aleta caudal y la pigmentación de los ejemplares (Ferguson y Taggart 1991, Pakkasmaa y Piironen 2001, Jonsson y Jonsson 2011). Desde el punto de vista ecológico, la Trucha Común presenta variaciones en su edad de maduración, tasa de crecimiento, nicho alimenticio, uso del hábitat y patrones migratorios (entre otros: Elliot 1994, Almodóvar 1999, Pakkasmaa y Piironen 2001, Nicola y Almodóvar 2002, 2004, Milner *et al.* 2003, Klemetsen *et al.* 2003, Parra *et al.* 2009, 2014). Las truchas anádromas o reos migran de los ríos o arroyos en los que han nacido al mar, para alimentarse hasta que alcanzan la madurez sexual, retornando al río donde nacieron para reproducirse. Por otro lado, las formas lacustres emigran de sus ríos natales a lagos, regresando igualmente a los ríos para desovar. En cambio, las truchas residentes o sedentarias realizan su ciclo de vida completo en los ríos reproduciéndose, generalmente, en pequeños afluentes en la zona donde nacieron (Elliot 1994, Almodóvar 2002). Estas formas pueden coexistir y reproducirse entre ellas (Hindar *et al.* 1991, Hansen *et al.* 2000a). Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos precisos y los posibles factores genéticos implicados en estos patrones biológicos diferentes (Almodóvar 2002, Jonsson y Jonsson 2011).

Además de una elevada diversidad morfológica, fisiológica y ecológica; a nivel genético la Trucha Común es una de las especies de vertebrados más polimórficas (Allendorf y Leary 1988, Ferguson 1989), presentando una elevada diferenciación a nivel interpoblacional tanto a escala local como europea, a menudo acompañada de una elevada variación fenotípica (Behnke

1986, Fergusson 1989, Bernatchez *et al.* 1992, Bernatchez 2001). Así, en el norte de Europa, el 40% de la variación genética es debida a diferencias entre poblaciones (Ryman 1983), aumentado esta proporción hacia el límite sur de su distribución (Allendorf y Leary 1988, Ferguson 1989, Machordom *et al.* 2000, Sanz *et al.* 2000, Antunes *et al.* 2001, Aurelle y Berrebi 2001, Aurelle *et al.* 2002, Presa *et al.* 2002). Sin embargo, la distribución de la variabilidad genética entre las poblaciones de Trucha Común es compleja. Algunos autores han observado una importante correlación entre la distancia genética y geográfica entre diferentes ríos pero no a nivel intrapoblacional (Morán *et al.* 1995, Hansen y Mensberg 1998, Aurelle y Berrebi 2001, Hansen *et al.* 2002), mientras que otros estudios han detectado procesos de aislamiento por distancia dentro de los propios ríos (Estoup *et al.* 1998, Carlsson y Nilsson 2000, Heggenes y Røed 2006, Griffiths *et al.* 2009a, Stelkens *et al.* 2012). Además, en otros casos se ha observado un elevado aislamiento entre poblaciones cercanas, e incluso simpátridas (Allendorf *et al.* 1976, Ferguson y Mason 1981, Ferguson y Taggart 1991, Palmé *et al.* 2013). En las cuencas mediterráneas, se observa una mayor diferenciación entre poblaciones dentro del mismo curso fluvial que entre ríos próximos (Sanz *et al.* 2002, Snoj *et al.* 2009, Keller *et al.* 2011, Lerceteau-Köhler *et al.* 2013). De hecho, los resultados obtenidos dentro de la Península Ibérica ponen de manifiesto la enorme singularidad de algunas poblaciones estudiadas (Sanz *et al.* 2002, 2011, Vera *et al.* 2010a).

A nivel biogeográfico, los estudios de electroforesis de proteínas definieron dos linajes diferenciados dentro de la distribución de la especie. El linaje más antiguo se encontraría distribuido por la Península Ibérica y el Mediterráneo, presentando la variable alélica *LDH-CI*100* del gen nuclear codificante para la subunidad cinco de la enzima lactato deshidrogenasa (*LDH-CI**). La línea evolutiva más moderna, distribuida por el Atlántico norte, presentaría fijado el alelo *LDH-CI*90* para este mismo gen (Hamilton *et al.* 1989, García-Marín *et al.* 1999a, 1999b). Actualmente, la distribución geográfica de ambas líneas no se encuentra claramente establecida, habiéndose observado al suroeste de Francia y en la cuenca del Danubio zonas de contacto secundario entre ambos linajes evolutivos (Aurelle y Berrebi 2001, Lerceteau-Köhler *et al.* 2013). Tanto en la Península Ibérica como en otros países del área mediterránea, las repoblaciones de los ríos se han llevado a cabo empleando truchas de origen centro y noreuropeo (entre otros: Largiadèr y Scholl 1996, Poteaux *et al.* 1999, Weiss *et al.* 2001, Almodóvar *et al.* 2006, Sanz *et al.* 2006, Kohout *et al.* 2012). Por lo tanto, la detección de la variante alélica *LDH-CI*90* en los ríos es un indicativo de procesos de introducción de truchas de origen foráneo, siendo este marcador de gran utilidad en los estudios de gestión poblacional y evaluación de las repoblaciones.

Por otro lado, Bernatchez *et al.* (1992) y Apostolidis *et al.* (1997), estudiando un fragmento de la región control del ADN mitocondrial, encontraron cinco linajes evolutivos distintos de la Trucha Común en Europa (Figura I.1). Un grupo se encontraría distribuido por toda la vertiente atlántica (linaje **AT**) y cuatro en la vertiente mediterránea, desde la Península Ibérica hasta el mar de Aral: linaje *Mediterráneo sensu strictu* o **ME**, *Adriático* o **AD**, *Danubio* o **DA**, y el linaje *Marmoratus* o **MA** detectado en algunas cuencas adriáticas. Trabajos posteriores han definido un sexto linaje mitocondrial con una distribución restringida a la cuenca interior del río Duero (**DU**, Suárez *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2009, Vera *et al.* 2010a), así

como una importante subestructuración del linaje Atlántico en tres grandes clados (Cortey *et al.* 2009). Aunque inicialmente se consideró una distribución alopátrica de todos estos linajes mitocondriales (Bernatchez 2001), otros estudios determinaron que se han producido intensos contactos secundarios entre aquellas líneas evolutivas distribuidas en los ríos mediterráneos (entre otros: Giufra *et al.* 1996, Apostolidis *et al.* 1997, Berrebi *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001, Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004, Vera *et al.* 2013, Lecerteau-Köhler *et al.* 2013, Schenekar *et al.* 2014) y en la cuenca del Duero (Cortey *et al.* 2009, Vera *et al.* 2010a).

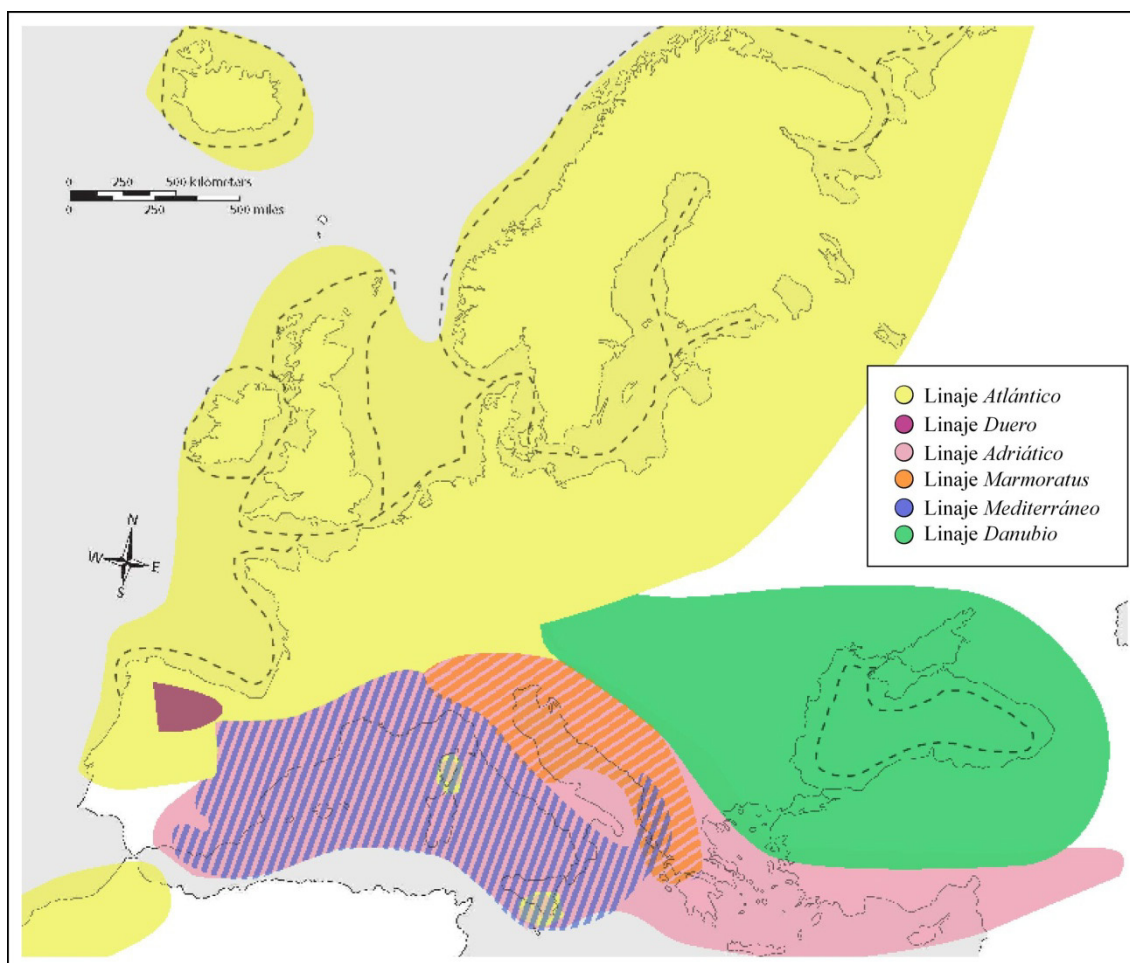


Figura I.1. Área de distribución nativa de los linajes mitocondriales definidos para la Trucha Común en Europa (áreas sombreadas). La distribución espacial de las formas anádromas es indicada con línea punteada (Jonsson y Jonsson 2011). Dibujo adaptado de Cortey (2005) y autores posteriores.

La crisis salina del Messiniense y las oscilaciones climáticas del Cuaternario han jugado un papel muy importante en la diferenciación y diversificación de las especies, siendo especialmente determinantes en la estructuración de la Trucha Común (entre otros: Hamilton *et al.* 1989, Osinov y Bernatchez 1996, García-Marín *et al.* 1999b, Bernatchez 2001, Weiss *et al.* 2000, Cortey *et al.* 2009, McKeown *et al.* 2010). De hecho, la identificación y el estudio de refugios glaciales han concentrado gran parte de las líneas de investigación en esta especie.

Según Hamilton *et al.* (1989), el linaje *LDH-C1*90* habría aparecido en un refugio al este del área cubierta por los hielos, recolonizando toda la zona atlántica al finalizar el periodo glacial. A pesar de que la situación de este refugio ha sido apoyada por Osinov y Bernatchez (1996), los estudios posteriores han mostrado un patrón más complejo, existiendo numerosos refugios glaciales y procesos de recolonización. García-Marín *et al.* (1999b) basándose en la variación de dos loci, propusieron la existencia de cuatro linajes evolutivos, tres de los cuales estarían involucrados en los procesos de recolonización postglacial del área atlántica: zona del Canal de la Mancha, área cantábrica y sur de Francia y región ponto-caspa. Según Bernatchez (2001), solo las dos primeras regiones habrían recolonizado las regiones más norteñas, mientras que Weiss *et al.* (2000) propusieron que estos refugios estarían situados más al norte. A partir de cuatro fragmentos mitocondriales, McKeown *et al.* (2010) postularon cinco refugios glaciales más, situados en el área atlántica, desde el sur de Inglaterra hasta el mar de norte. Por otro lado, las penínsulas mediterráneas apenas estuvieron afectadas por los hielos, lo que permitió la diversificación y el contacto entre especies y linajes durante estos periodos desfavorables (Cooper y Hewitt 1993, Hewitt 1996, Gómez y Lunt 2007). Sin embargo, según se van detectando nuevos refugios glaciales para las distintas especies dulceacuícolas, para algunos autores la importancia y el impacto relativo de las glaciaciones del Cuaternario están actualmente en debate (Levy *et al.* 2009, Perea *et al.* 2010, Dubut *et al.* 2012).

Las poblaciones de Trucha Común presentan fronteras biogeográficas que sirven para distinguir los ríos, cuencas o vertientes como unidades diferenciadas (Bernatchez *et al.* 1992, Giuffra *et al.* 1994, Apostolidis *et al.* 1997, Suárez *et al.* 2001). En la Península Ibérica, los primeros análisis genéticos en la Trucha Común pusieron de manifiesto una elevada diferenciación entre las poblaciones (García-Marín *et al.* 1991), destacando una diferenciación significativa entre los ríos atlánticos y mediterráneos (García-Marín y Pla 1996). Los estudios realizados por Machordom *et al.* (2000) a través del análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial, permitieron definir cinco OCUs en la Península Ibérica: *Cantábrica* (incluyendo haplotipos *Noratlánticos*), *Atlántica* o *Tajo*, *Duero*, *Suribérica* y *Mediterránea* (Figura I.2). Este patrón fue corroborado y puesto en contexto europeo por Suárez *et al.* (2001) tras el análisis de la secuencia completa de la región control del ADN mitocondrial, identificando un total de cuatro linajes evolutivos principales: *Atlántico* (incluyendo haplotipos *Noratlánticos*, *Cantábricos* y *Suratlánticos* o *Tajo*), *Duero*, *Mediterráneo* y *Andaluz* (linaje *Adriático sensu* Bernatchez *et al.* 1992). El linaje *Adriático* ocuparía los ríos del sur de la Península Ibérica, mientras que la línea *Mediterránea* se distribuiría desde la cuenca del Segura hacia el norte, siendo el propio Segura una zona híbrida entre estos dos linajes evolutivos (Figura I.2). Los resultados obtenidos posteriormente por Sanz *et al.* (2002) y Cortey *et al.* (2004) mostraron una distribución en mosaico entre los linajes *Adriático* y *Mediterráneo*, con numerosos contactos secundarios generados por procesos de expansión poblacionales y por deriva genética durante el periodo postglacial (Figura I.2). Estos datos no coinciden con las ideas iniciales de algunos autores de falta de diferenciación entre las poblaciones de Trucha Común en España y su pertenencia al tipo *Mediterráneo sensu* Bernatchez *et al.* (1992) (Morán *et al.* 1995). Sin embargo, han servido para definir claramente diferentes áreas biogeográficas que deberían tenerse en cuenta en la toma de decisiones de ordenación de la pesca.

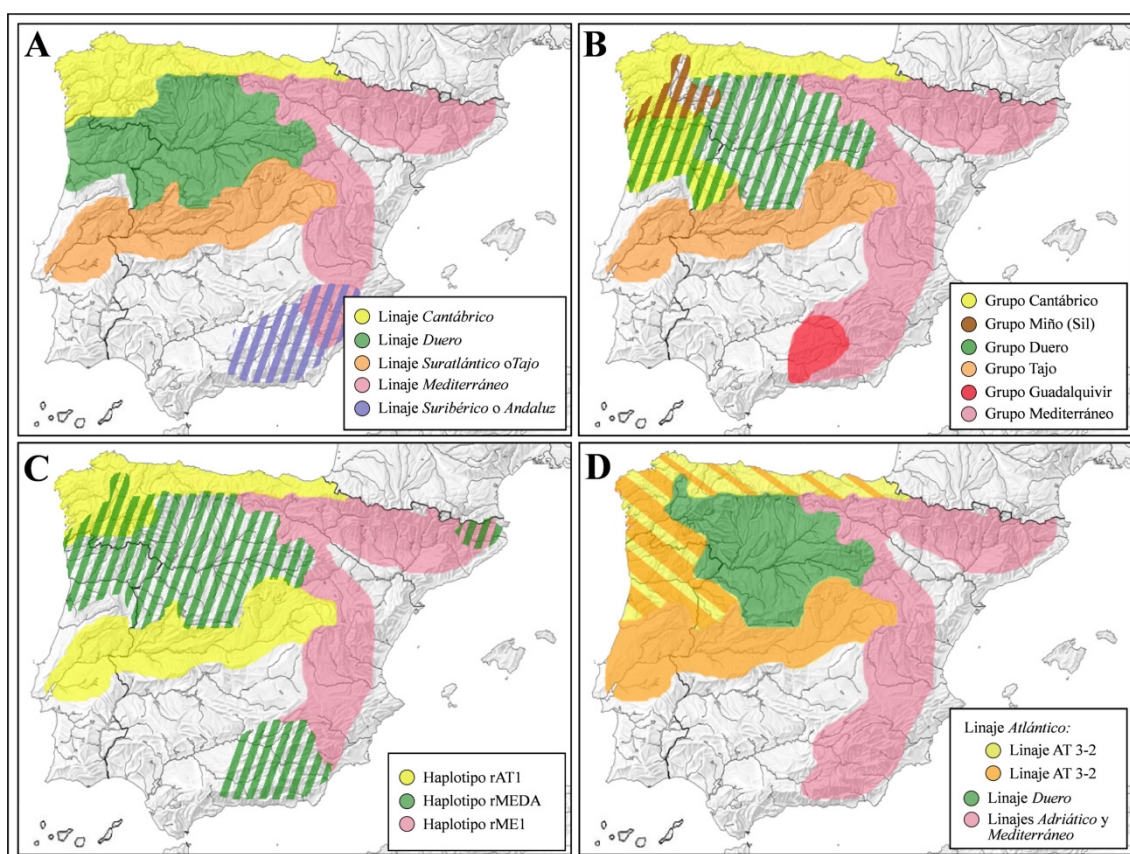


Figura I.2. Área de distribución nativa de los linajes mitocondriales (A y D) y nucleares (B y C) definidos para la Trucha Común en la Península Ibérica (áreas sombreadas). Dibujos adaptados de (A) Machordom *et al.* (2000) y Suárez *et al.* (2001), (B) Sanz *et al.* (2000, 2002), (C) Presa *et al.* 2002 y (D) Cortey *et al.* (2004, 2009). Los grupos definidos por los autores citados son indicados en la leyenda.

Entre las técnicas que se han utilizado para el estudio de las relaciones evolutivas y la estructura genética de las poblaciones naturales de Trucha Común se encuentran la electroforesis de proteínas, el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN (*Restriction fragment length polymorphism analysis*, RFLP), la secuenciación de genes nucleares y mitocondriales y el estudio de loci microsatélites. De hecho, actualmente existe un gran número de marcadores genéticos disponibles para la especie, con características muy distintas a nivel de requisitos técnicos, facilidad de análisis y coste. Sin embargo, la elección de un marcador u otro siempre debe ir determinada por el tipo de información y las preguntas que se pretenden responder (Schlötterer 2004), así como por el nivel de resolución requerido.

La mayor parte de los estudios filogeográficos se han centrado en el análisis del ADN mitocondrial, a causa de la ausencia de recombinación intermolecular y su alta variación intraespecífica (Avice 2004, Ballard y Whitlock 2004). En este sentido, la Trucha Común no ha sido una excepción (entre otros: Bernatchez *et al.* 1992, Bernatchez 2001, Suárez *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2004, 2009, McKeown *et al.* 2010). El uso exclusivo del ADN mitocondrial para definir unidades evolutivas desvía la interpretación de los resultados hacia las líneas matriarcales, que pueden no recoger todos los procesos evolutivos que ha sufrido una especie

(Degnan 1993, Palumbi y Baker 1994, Antunes *et al.* 2002). Por tanto, hoy en día está aumentando el uso combinado de marcadores nucleares y mitocondriales para establecer la distribución geográfica de las líneas genealógicas (Bernardi *et al.* 1993, Tessier *et al.* 1995, Allendorf y Seeb 2000, Avise 2004), así como para proporcionar una idea más completa del estado genético de las poblaciones empleando, como es el caso de la Trucha Común, los resultados obtenidos para su conservación y gestión (entre otros: Snoj *et al.* 2011, Lerceteau-Köhler *et al.* 2013, Meraner *et al.* 2013, Vera *et al.* 2013, Schenekar *et al.* 2014).

Por otro lado, el análisis de loci microsatélites ha sido muy eficaz en Europa tanto en la identificación de poblaciones repobladas y nativas, como en el estudio de la diversidad y diferenciación genética en la Trucha Común (entre otros: Poteaux *et al.* 1999, Hansen *et al.* 2000b, 2002, 2006, 2012, Jug *et al.* 2005, Meier *et al.* 2011, Lerceteau-Köhler *et al.* 2013, Schenekar *et al.* 2014). En la Península Ibérica son numerosos los trabajos que han empleado el análisis de loci microsatélites en esta especie (entre otros: Cagigas *et al.* 1999, Corujo *et al.* 2004, Ayllón *et al.* 2006, Campos *et al.* 2006, 2007, Sanz *et al.* 2006, Hórreo *et al.* 2011, Vera *et al.* 2013). Sin embargo, los datos analizados de poblaciones suribéricas son apenas inexistentes (Sanz *et al.* 2006). La mayor sensibilidad de los microsatélites a la hora de detectar pequeños cambios genéticos a escala microgeográfica, los convierte en unos marcadores muy adecuados para detectar tanto la introgresión como la diversidad genética, complementando la información obtenida con otros marcadores genéticos. Además, en las poblaciones donde ha existido un gran esfuerzo de repoblación, los análisis basados en un único locus, tradicionalmente el locus *LDH-CI**, presentan algunas desventajas, ya que un resultado negativo no implica que la muestra analizada sea totalmente autóctona y viceversa. Por tanto, el análisis combinado con loci microsatélites permite identificar inequívocamente los individuos procedentes de repoblación de los nativos, detectando ejemplares híbridos que por su bajo grado de introgresión no serían identificados.

I.3. Área de estudio

Los procesos de distribución geográfica y especiación de la fauna y flora europea son el resultado de una compleja historia geológica y paleoclimática (Hewitt 1999, 2000), sin que la ictiofauna europea sea una excepción (Lelek 1980, Bănărescu 1990, 1992). De hecho, la historia evolutiva de los peces de agua dulce no solo está marcada por la existencia de barreras infranqueables como montañas y mares, sino también por cambios en la disposición de las propias cuencas hidrográficas, pudiendo aislarse o conectarse los cursos fluviales tanto por modificaciones geográficas, como por cambios erosivos o climáticos (Bernatchez y Wilson 1998, Waters *et al.* 2001, Willett *et al.* 2014) o cambios de rangos de distribución asociados a las oscilaciones climáticas del Cuaternario (Bănărescu 1989, 1992, Bianco 1990, Hewitt 1999, 2000).

Los ríos de la Península Ibérica se encuentran aislados del resto de Europa por los Pirineos y de África por el estrecho de Gibraltar, siendo el hábitat de 61 especies nativas de peces dulceacuícolas, 41 de ellas endémicas (Doadrio *et al.* 2011). La alta proporción de endemismos hacen de esta zona una área de especial relevancia, no solo científica, sino también

patrimonial y conservacionista (Filipe *et al.* 2009, Doadrio *et al.* 2011). A pesar de ello, el estado de la ictiofauna continental es muy pobre, presentando las mayores concentraciones de peces amenazados del área mediterránea (Smith y Darwall 2006). La degradación y fragmentación del hábitat junto con la introducción de especies exóticas son los principales causantes del declive de los peces de agua dulce, debiendo ser incluido el 93% de las especies autóctonas ibéricas dentro de alguna categoría de amenaza (Doadrio *et al.* 2011).

En la presente Tesis Doctoral, se incluyen los resultados obtenidos en 34 ríos suribéricos (Anexo I), incluyendo todos los cursos fluviales de la zona en los que la Trucha Común presenta una distribución nativa. Según la regionalización de la Península Ibérica para la ictiofauna continental realizada por Doadrio *et al.* 2011, el área de estudio de este trabajo incluiría las regiones de la cuenca del Guadalquivir (subregión Alto Guadalquivir), cuencas del Sur y cuenca del Segura. La Trucha Común habita de manera natural los tramos altos de estas regiones, compartiendo su área de distribución con el Barbo gitano (*Luciobarbus sclateri*, Günther 1868) y el cacho (*Squalius pyrenaicus*, Günther 1868), y en la cuenca del Guadalquivir, con la boga meridional (*Pseudochondrostoma willkommii*, Steindachner 1866) y el calandino (*Squalius alburnoides*, Steindachner 1866). A pesar de que la mayor parte de las localidades estudiadas se encuentran bajo algún criterio de protección, los cursos analizados presentan numerosas alteraciones provocadas por la actividad humana, como presas con usos diversos (algunas de ellas infranqueables), canalizaciones y usos ganaderos e industriales.

Hasta mediados del Pleistoceno las cuencas del sur de la Península Ibérica no se encontraban definidas tal y como las conocemos actualmente (de Galdeano y Vera 1991, Vera 2000, de Galdeano y Alfaro 2004). La Cordillera Bética experimentó una primera elevación general durante el Mioceno inferior y medio, originándose un conjunto de cuencas en el interior del orógeno denominadas Cuencas intracadena y Cuenca del Antepaís o Estrecho Nordbético. Durante este periodo, los ríos que nacen en la Cordillera Bética habrían formado cuencas aisladas que drenarían directamente al mar, con una línea de costa situada a 820 y 900 metros sobre el nivel actual (de Galdeano y López-Garrido 2000, de Galdeano y Alfaro 2004). Por otro lado, la mayor parte de la actual cuenca del Segura estaría sumergida, estando su cabecera actual constituida por islas separadas y conectadas por estrechos marinos. Durante el Mioceno superior y Pleistoceno la Cuenca del Antepaís (cuenca del Guadalquivir) y las Cuencas Postorogénicas béticas (cuenca de Granada y Guadix-Baxa, entre otras) se separaron debido al cierre del estrecho Nordbético, generándose en el área del Rif una desconexión más o menos completa entre el Atlántico y Mediterráneo. Durante este periodo, las cuencas de Granada y Guadix-Baxa quedarían aisladas del litoral mediterráneo, formando grandes lagos endorreicos durante toda la crisis del Messiniense. Durante este periodo, el descenso del nivel del mar en el litoral mediterráneo conectó cursos hidrográficos anteriormente aislados, comenzando un proceso de encajamiento fluvial que continuaría hasta la actualidad (de Galdeano y López-Garrido 2000, de Galdeano y Alfaro 2004). Los movimientos tectónicos de finales del Mioceno, habrían provocado la continentalización de la cuenca del Segura, continuando su formación hasta finales del Cuaternario (Elizaga y Calvo 1988, de Galdeano y Vera 1991, de Galdeano y Alfaro 2004). Por otro lado, a finales del Mioceno en el litoral atlántico, el Guadalquivir habría comenzado un proceso de erosión remontante hacia su cabecera, capturando a finales del

Pleistoceno Medio las aguas del Guadix-Baza y Granada debido a un nuevo levantamiento y basculamiento de toda el área (Ruiz-Bustos *et al.* 1990, Ortiz *et al.* 2000, Ruano *et al.* 2000, Rodríguez-Vidal y Gracia-Prieto 2004).

La distribución de las especies y la alta diversidad encontrada en la Península Ibérica está fuertemente influenciada por la compleja historia geomorfológica y el papel de las glaciaciones del Cuaternario (Gómez y Lunt 2007). Las oscilaciones climáticas del Cuaternario parecen haber jugado un papel importante en la estructuración y diversificación de los peces ibéricos dulceacuícolas (entre otros: Cortey *et al.* 2004, 2009, Melo-Ferreira *et al.* 2005, Martínez-Solano *et al.* 2006, Godinho *et al.* 2008, Gante *et al.* 2009). Sin embargo, la ictiofauna continental es muy antigua, presentando algunas especies patrones de distribución que reflejan la configuración fluvial existente antes de este periodo (Doadrio y Carmona 2003, 2004, Sanjurjo *et al.* 2003, Cunha *et al.* 2004, Levy *et al.* 2009, Perea *et al.* 2010, Gante *et al.* 2010, Sousa-Santos *et al.* 2014). Por tanto, el estudio de estos patrones de distribución ayudaría a entender los procesos de colonización y diversificación que han dado lugar a la distribución actual de los peces de agua dulce.

II. OBJETIVOS

El objetivo global de esta Tesis es realizar una aproximación al conocimiento de la variabilidad y estructuración genética de la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica, así como los procesos implicados en la distribución actual de la especie de estudio en el suroeste europeo. La combinación de varios tipos de marcadores moleculares proporcionará una idea completa del estado genético de las poblaciones suribéricas así como de los procesos involucrados en la creación y el mantenimiento de su diversidad genética. Con ello se podrán distinguir las poblaciones autóctonas de las introducidas y estudiar el grado de introgresión entre ambas, así como conocer la diversidad genética y estado de las poblaciones nativas. Asimismo, se pretende encuadrar los resultados obtenidos a nivel mediterráneo y europeo, permitiendo conocer los procesos implicados en la distribución actual de los linajes suribéricos en el Mediterráneo occidental. Estos resultados podrán ser aplicados a futuros planes de ordenación de la pesca en esta área, permitiendo impulsar iniciativas para la conservación y gestión a escala local y regional de la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica.

Para lograr este objetivo general se plantean los siguientes objetivos parciales:

Capítulo III: Introgresión genética de la Trucha Común *Salmo trutta* en el sur de la Península Ibérica.

1. Identificar y cuantificar el impacto genético de las repoblaciones con ejemplares exóticos en el sur de la Península Ibérica.
2. Comparar la evolución temporal de la introgresión genética sobre las poblaciones suribéricas de Trucha Común
3. Evaluar la eficiencia de los marcadores genéticos empleados en la detección de ejemplares alóctonos e híbridos.

Capítulo IV: Diversidad y estructuración genética de la Trucha Común *Salmo trutta* en el sur de la Península Ibérica.

4. Evaluar y cuantificar la variabilidad genética intra e interpoblacional dentro de las cuencas suribéricas.
5. Caracterizar el nivel de estructuración y fragmentación genética tanto intra como interpoblacional.
6. Reconstruir la historia demográfica y los patrones de dispersión de la especie de estudio en el sur de la Península Ibérica.

Capítulo V: Filogeografía de la Trucha Común *Salmo trutta* en el suroeste europeo.

7. Establecer las relaciones filogenéticas y filogeográficas de la Trucha Común en su área de distribución nativa.
8. Datar los principales eventos de diversificación de la especie en el área del Mediterráneo occidental, enfocándose principalmente en aquellos linajes evolutivos con distribución ibérica.
9. Reconstruir la historia evolutiva y los procesos de expansión, fragmentación y contactos secundarios ocurridos en el sur de la Península Ibérica en base a su historia paleogeográfica.

III. INTROGRESIÓN GENÉTICA DE LA TRUCHA COMÚN *SALMO TRUTTA* EN EL SUR DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

III.1. INTRODUCCIÓN

La preservación de la diversidad genética es primordial en la conservación de las poblaciones, ya que representa la materia prima sobre la que se ejercen los cambios evolutivos dentro de las poblaciones (Groom *et al.* 2006). Por lo tanto, la pérdida o deterioro de esta diversidad disminuye la capacidad de adaptación de los organismos ante las variaciones ambientales. La introducción de especies invasoras o ejemplares exóticos está considerada como una de las principales causas de disminución de la biodiversidad mundial (*Convention on Biological Diversity*, CBD, <http://www.cbd.int>), afectando en gran medida a la fauna dulceacuícola (Elvira y Almodóvar 2001, Cambray 2003, Clavero y García-Berthou 2005, Helfman 2007). La colonización de nuevos hábitats por parte de los organismos es común en el medio acuático, sin embargo, los seres humanos proporcionan vías artificiales que favorecen que las especies y poblaciones alóctonas superen las barreras biogeográficas existentes (Rahel 2007). De hecho, los peces son el grupo de animales acuáticos más introducido a nivel mundial (624 especies, Gozlan 2008), siendo además uno de los grupos más amenazados, con 2110 especies en el año 2013 (*International Union for Conservation of Nature*, IUCN, <http://www.iucn.org/>). En concreto, en la Península Ibérica las introducciones de peces dulceacuícolas han aumentado significativamente durante el siglo XX, y en especial en las últimas décadas (Elvira y Almodóvar 2001, Ribeiro *et al.* 2009).

La introducción de ejemplares foráneos puede llevar a cruzamientos entre especies o linajes, comprometiendo la integridad del acervo genético nativo. De hecho, los eventos de hibridación e introgresión genética son más frecuentes en los peces que en otros vertebrados con divergencia genética similar (Epifanio y Nielsen 2001). Los niveles de hibridación e introgresión han aumentado drásticamente en todo el mundo debido a las translocaciones intencionadas o accidentales de los organismos y a las modificaciones del hábitat generadas por el hombre (Allendorf *et al.* 2001, Scribner *et al.* 2001, Costedoat *et al.* 2005), contribuyendo a la extinción de muchas especies y poblaciones (Allendorf *et al.* 2001, Wolf *et al.* 2001). De hecho, la disminución de la diversidad genética y el riesgo de extinción son mayores en poblaciones adaptadas localmente (Rhymer y Simberloff 1996, Lynch y O'Hely 2001).

La introgresión genética y sus efectos han sido ampliamente estudiados en la Trucha Común (Hansen 2002, Ruzzante *et al.* 2004, Sønstebo *et al.* 2008a, Hansen *et al.* 2009, 2010) y en especial en las poblaciones mediterráneas e ibéricas (Largiadèr y Scholl 1996, Poteaux *et al.* 1999, Almodóvar *et al.* 2001, 2006, Weiss *et al.* 2001, Sanz *et al.* 2006, Kohout *et al.* 2012), donde la introducción de truchas alóctonas y las translocaciones poblacionales han influido en la estructura e integridad genética de las poblaciones nativas, poniendo en contacto linajes evolutivos altamente divergentes. Sin embargo, tanto el alcance como la distribución de la introgresión son prácticamente desconocidos en el sur de la Península Ibérica, no existiendo datos sobre su evolución temporal en estas poblaciones. Los pocos trabajos elaborados (García-Marín 1992, Doadrio *et al.* 1996b, García-Marín y Pla 1996, Sanz *et al.* 2002, 2006, Machordom 2003, Almodóvar *et al.* 2006) incluyeron un número muy reducido de localidades por cuenca (entre uno y cuatro puntos de muestreo) no pudiendo ser extrapolados a todo el área de estudio. Además, cabe destacar, que la posición de la Península Ibérica es crucial para la

conservación de la diversidad genética de la Trucha Común (Almodóvar *et al.* 2006). Sin embargo, la singularidad genética de las poblaciones está actualmente amenazada debido a la introgresión de genes alóctonos, causada por la repoblación de los ríos con truchas de origen centro y noreuropeo (Elvira 1995, Machordom *et al.* 1999, Elvira y Almodóvar 2001, Almodóvar *et al.* 2001, 2002, 2006). De hecho, Almodóvar *et al.* 2006 observaron introgresión de genes de origen alóctono en casi la mitad de las 307 poblaciones ibéricas de Trucha Común analizadas, detectándose en los ríos mediterráneos unos niveles muy superiores a los encontrados en los ríos atlánticos.

Las actuaciones técnicas de gestión de la pesca en España se han fundamentado principalmente en la idea de aumentar los efectivos poblacionales mediante repoblación, ante el problema de la disminución de las capturas. Estas acciones se han aplicado sin análisis previo ni control de su eficacia, con el consiguiente riesgo para las comunidades de peces autóctonos. Como se ha indicado anteriormente, en el caso de la Trucha Común, la repoblación con ejemplares procedentes de piscifactorías de origen centroeuropeo y noreuropeo ha producido una sensible reducción de la diversidad genética de las poblaciones naturales e incluso una pérdida de combinaciones genéticas únicas (Machordom *et al.* 1999, Almodóvar *et al.* 2001, 2006). La sociedad, incluidos algunos colectivos de pescadores, empieza a concienciarse de la importancia de conservar las poblaciones naturales desde una visión más global, en la que toman relevancia valores como el mantenimiento de la biodiversidad y el patrimonio genético. La demanda social, unida al desarrollo de técnicas potentes y precisas para caracterizar genéticamente las poblaciones, ha marcado nuevos retos de cara a la gestión de los recursos dulceacuícolas. Así, la gestión no debe buscar únicamente mantener un número elevado de efectivos, sino que debe garantizar el futuro de las poblaciones y de su patrimonio genético.

Los datos sobre introgresión y diversidad genética han provocado un replanteamiento de la gestión de las poblaciones de truchas en diversas Comunidades Autónomas. Atendiendo a esta demanda, a nivel nacional y autonómico se han prohibido actualmente las repoblaciones con truchas foráneas, en un intento de reducir la introgresión con ejemplares alóctonos y de recuperar al máximo la diversidad genética original de las poblaciones. Sin embargo, aún en día se están introduciendo regular y sistemáticamente ejemplares exóticos en numerosos tramos de pesca intensiva y cotos, todo ello autorizado por algunos Gobiernos Regionales. Por otro lado, en algunas Comunidades Autónomas se están implantando medidas como el desarrollo de “líneas puras o autóctonas” en piscifactorías, proponiéndose eliminar las líneas foráneas de uso frecuente hasta hace muy poco. Sin embargo, para el desarrollo de estas líneas es necesario tener un conocimiento previo de las unidades genéticas de las diferentes poblaciones, con el fin de preservar los acervos génicos propios de cada región, que son los mejor adaptados en cada río.

El objetivo principal del presente capítulo es evaluar y cuantificar el impacto genético de las repoblaciones con ejemplares exóticos sobre las poblaciones suribéricas de Trucha Común. Los resultados obtenidos se compararán con la bibliografía existente, lo que permitirá estudiar la evolución temporal de la introgresión en un periodo de diez años. Asimismo, se evaluará la eficiencia relativa de los distintos marcadores empleados. Los resultados obtenidos podrán ser extrapolados a otras poblaciones mediterráneas y permitirán el diseño de directrices

de gestión que podrían ser aplicadas en futuros planes de ordenación de la pesca en las poblaciones ibéricas de Trucha Común.

III.2. MATERIAL Y MÉTODOS

III.2.1. Recogida de muestras

En los años 2005 y 2009 se recogieron 2102 muestras de Trucha Común en 34 ríos del sur de la Península Ibérica, incluyendo todas las poblaciones donde la especie está presente actualmente de manera nativa. En el Anexo I se indican para cada localidad el número de truchas capturadas y el año de muestreo. Dichos muestreos fueron realizados por el equipo de la Universidad Complutense de Madrid (año de muestreo: 2005) y la Agencia de Medio Ambiente y Agua de Andalucía (años de muestreos: 2005 y 2009).

Los ejemplares fueron capturados mediante pesca eléctrica intentando, siempre que fuera posible, tener una uniformidad de talla en las truchas capturadas. El número de ejemplares por localidad dependió tanto de la disponibilidad de peces en el río en el momento de captura como de las autorizaciones obtenidas con fines científicos; alcanzando como máximo 35 individuos por población muestreada.

Una vez capturados los ejemplares fueron anestesiados con tricaina metansulfonato (MS222), tomándose una muestra de la aleta adiposa que fue conservada en etanol al 70% para su posterior tratamiento, devolviendo finalmente los peces vivos al río. En el laboratorio cada tejido fue sometido a varios lavados con agua destilada para su rehidratación y, posteriormente, se conservó a -80 °C.

III.2.2. Análisis de laboratorio

III.2.2.1. Extracción de ADN

Se aisló el ADN de 2102 muestras de aleta adiposa conservadas previamente a -80 °C. En primer lugar, el ADN procedente de las muestras capturadas en 2005 (1604) se extrajo siguiendo el protocolo estándar de extracción con fenol y alcohol isoamílico de Sambrook *et al.* (1989). Este método de extracción de ácidos nucleicos consiste en una digestión proteica, seguida de la extracción del ADN disuelto en la fase orgánica mediante fenol y alcohol isoamílico o cloroformo. Para ello, primeramente es necesario añadir proteinasa K y un detergente como el dodecilsulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*, SDS) para lisar las células, eliminar las proteínas responsables del empaquetamiento del ADN y proteger los ácidos nucleicos de la acción de las nucleasas endógenas. Al mezclar el fenol y el alcohol isoamílico con el producto resultante de la lisis, las proteínas son emulsionadas, desnaturalizadas y separadas del ADN. El fenol junto con los restos de proteínas y material celular permanecerá en la fase orgánica, mientras que los ácidos nucleicos permanecerán solubles en la fase acuosa. La diferencia de densidades entre las fases acuosa y orgánica permite recuperar fácilmente el ADN por centrifugación o utilizando una micropipeta. La extracción del ADN total de un organismo a

partir de un protocolo con fenol y alcohol isoamílico o fenol y cloroformo, ha sido el método más empleado en peces hasta principios de este siglo, obteniéndose buenos resultados con muestras de distintos orígenes (Almodóvar *et al.* 2000, Aurelle y Berrebi 2001, Wasko *et al.* 2003, McKeown *et al.* 2010, Chaturvedi *et al.* 2011). A pesar de los buenos resultados que se consiguen tanto en pureza como concentración de ADN, este método de extracción es lento, laborioso y contaminante (Yue y Orban 2001), pero ha constituido la única posibilidad factible económicamente para muchos laboratorios hasta hace relativamente poco.

Por otra parte, el ADN procedente de las 498 muestras restantes, correspondientes a los ejemplares capturados en 2009, se aisló por medio de la utilización del kit comercial de extracción *REALPURE SPIN* (Durviz, Valencia, España), basado en la técnica de cromatografía de adsorción y desorción. El protocolo empleado incluye una lisis en SDS y proteinasa K seguida de la adición de una solución caotrópica, creando un entorno hidrofóbico alrededor del ADN. En estas condiciones, los ácidos nucleicos se unen a la membrana de fibra de vidrio situada en una columna. Una vez lavado de contaminantes, el ADN es recuperado utilizando un tampón de elución. De esta manera las sales, las enzimas y los nucleótidos no retenidos por dicha membrana son eliminados sin necesidad de utilizar un protocolo con fenol y alcohol isoamílico.

La pureza y la concentración del ADN extraído para cada ejemplar fueron valoradas con espectrofotometría en un biofotómetro (Eppendorf Ibérica, Madrid, España), diluyendo las muestras a concentraciones entre 100 ng/μl y 400 ng/μl en los casos en que fue necesario. La pureza de cada muestra fue evaluada a través del análisis de la proporción de absorbancias a 260 nm y 280 nm. Los valores de absorbancia obtenidos oscilaron entre 1,7 y 2,1 por lo que no fue necesario realizar ningún tratamiento complementario. La calidad del ADN extraído fue analizada por medio de geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio y expuestos a luz ultravioleta. La posible degradación de cada muestra fue valorada visualmente, así como la presencia o ausencia de ARN.

III.2.2.2. Amplificación y genotipado del locus *LDH-C1**

La introgresión genética en los ríos suribéricos se estudió mediante la técnica de PCR-RFLP descrita por McMeel *et al.* (2001), que se basa en el análisis del locus diagnóstico nuclear *LDH-C1** de la enzima L-lactato deshidrogenasa (*L-LDH*, EC 1.1.1.27).

El ADN extraído de 2000 ejemplares (Anexo II) se amplificó mediante PCR, con la utilización de los cebadores LDHxon 3F (5'-GGCAGCCTCTTCCTCAAAACGCCCAA-3') y LDHxon 4R (5'-CAACCTGCTCTCTCCCTCCTGCTGACGAA-3') desarrollados por McMeel *et al.* (2001). La reacción de PCR se realizó para cada individuo en un volumen de 50 μl, con concentraciones finales de 1X de tampón de PCR libre de magnesio, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,4 μM de cada cebador, 0,5 U de enzima *Biotools DNA Polymerase* (Biotools, Madrid, España) y 100-200 ng de ADN. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) utilizando un programa de 95°C 5 minutos, 30 ciclos de 95°C 1 minuto, 62°C 1 minuto y 72°C 1 minuto, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. El fragmento amplificado fue visualizado por

electroforesis en un gel de agarosa al 2,5% teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz ultravioleta, obteniendo resultados de amplificación positivos en 2000 ejemplares.

El genotipado de los individuos se realizó a través de la digestión del fragmento amplificado con la enzima de restricción BslI (New England Biolabs, IZASA, Barcelona, España). La reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen de 20 μ l con una concentración final de buffer NE 3 de 1X y 5 U de enzima para digerir 10 μ l de producto de amplificación. Los fragmentos obtenidos fueron separados y visualizados empleando la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2,5% teñido con bromuro de etidio. La variante alélica *LDH-CI*90*, indicador de ejemplares de repoblación o de sus descendientes, presenta una secuencia diana reconocida por la enzima BslI (CCNNNNN/NNGG). Debido a la acción de esta endonucleasa se generan dos fragmentos de 360 y 80 pares de bases (pb). Por otro lado, el alelo *LDH-CI*100*, indicador de ejemplares autóctonos, no posee dicha diana, presentando un único fragmento de 440 pb visible en el gel. Dado que este locus es de herencia codominante, los heterocigotos presentarán tres fragmentos de 440, 360 y 80 pb. La separación de los fragmentos de 440 y 360 pb permitió asignar a cada individuo como nativo (*LDH-CI*100/100*), exótico (*LDH-CI*90/90*) o híbrido (*LDH-CI*90/100*), no siendo necesario correr el gel completamente para separar el fragmento de 80 pb de los cebadores y ahorrando tiempo de trabajo (Figura III.1).

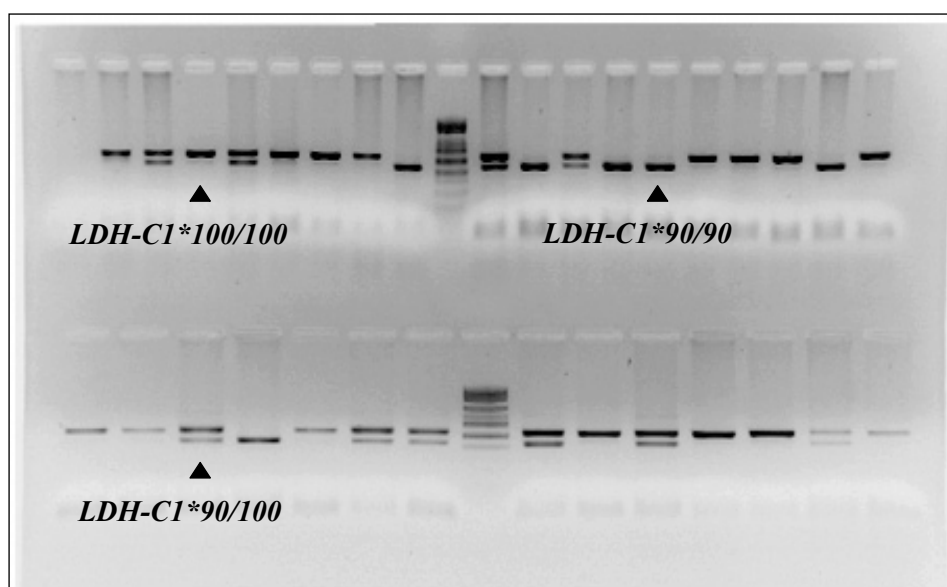


Figura III.1. Patrones de genotipado observados en un gel de agarosa tras la digestión del locus *LDH-CI** con la enzima BslI en la Trucha Común.

III.2.2.3. Amplificación y genotipado de loci microsatélites

El aumento de la introgresión disminuye la eficiencia a la hora de detectar los ejemplares procedentes de repoblación (Sanz *et al.* 2009). Por ello, se planteó comparar los resultados del marcador diagnóstico *LDH-CI** con los obtenidos a partir de otros marcadores nucleares. Se analizó la variabilidad alélica de 890 ejemplares empleando ocho microsatélites por muestra: Str15, Str60, Str73 (Estoup *et al.* 1993), Ssa85, Ssa197 (O'Reilly *et al.* 1996), SSOSL417 (Slettan *et al.* 1995), SSOSL438 (Slettan *et al.* 1996) y BFRO 002 (Susnik *et al.* 1997). Las localidades analizadas y el número de ejemplares por localidad están descritos en el Anexo II.

Cada locus fue amplificado individualmente mediante PCR con la utilización de cebadores específicos marcados con los fluorocromos FAM o HEX. La secuencia de los cebadores utilizados, así como su motivo repetido, su marcaje y el programa de PCR empleado para la amplificación de cada locus están incluidos en la Tabla III.1. Las reacciones de PCR se realizaron para cada individuo en un volumen de 25 µl con concentraciones finales de 1X de tampón de PCR libre de magnesio, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1-0,2 µM de dNTPs, 0,1-0,4 µM de cada cebador, 1-1,25 U de enzima *Biotools DNA Polymerase* (Biotools, Madrid, España) y 50 ng de ADN.

Cada fragmento de ADN amplificado fue visualizado por electroforesis en un gel de agarosa al 2,5%, teñido con bromuro de etidio. El genotipo fue determinado mediante la técnica de lectura de fragmentos en un secuenciador automático *ABI PRISM 3730* (Applied Biosystems), mezclando los productos previamente amplificados en tres lotes según su tamaño y marcaje.

Tabla III.1. Secuencia de los cebadores empleados, motivo repetido, marcador fluorescente y programa de amplificación de PCR utilizado para el análisis de los loci microsatélite en la Trucha Común.

Locus	Motivo	Secuencia del cebador (5' → 3')	Fluorocromo	Programa de amplificación
Str15	(CT) _n	F: TGCAGGCAGACGGATCAGGC R: AATCCTCTACGTAAGGGATTTC	5'-FAM	
Str60	(GT) _n	F: CGGTGTGCTTGTCAGGTTTC R: GTCAAGTCAGCAAGCCTCAC	5'-FAM	95°C 5 min, x30 [94°C 30 seg, 58°C 30 seg, 72°C 30 seg], 72°C 10 min
Str73	(GT) _n	F: CCTGGAGATCCTCCAGCAGGA R: CTATTCTGCTTGTAACCTAGACCTA	5'-FAM	
Ssa85	(GT) _n	F: AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC R: ACCCGCTCCTCACTTAATC	5'-HEX	95°C 5 min, x30 [95°C 20 seg, 58°C 20 seg, 72°C 20 seg], 72°C 10 min
Ssa197	(GTGA) _n GT	F: GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG R: TGGCAGGGATTGACATAAC	5'-FAM	
SSOSL417	(GT) _n	F: TTGTTTCAGTGTATATGTGTCCCAT R: GATCTTCACTGCCACCTTATGACC	5'-FAM	
SSOSL438	(GT) _n	F: GACAACACACAACCAAGGCAC R: TTATGCTAGGTCTTTATGCATTGT	5'-FAM	95°C 5 min, x30 [95°C 40 seg, 60°C 40 seg, 72°C 40 seg], 72°C 10 min
BFRO002	(GT) _n	F: ATGTTTTTGACTGCACTATGTATT R: GGAGATAAGAGTCAACGAGGC	5'-HEX	

II.2.3. Análisis de datos

II.2.3.1. Caracterización de loci microsatélites

El genotipado de cada microsatélite fue realizado mediante el estudio de los perfiles de intensidades de fluorescencia con ayuda del programa *PEAK SCANNER* v.1.0 (Applied Biosystems), determinándose la longitud en pares de bases (pb) de los distintos alelos manualmente (Figura III.2).

Cuando se trabaja con loci microsatélites los errores de genotipado pueden influir notablemente en los resultados obtenidos (Pompanon *et al.* 2005). Los errores de lectura más frecuentes son los causados por la presencia de alelos nulos y los asociados con el “tartamudeo de picos” (*stutter peaks*), dificultando la discriminación entre ejemplares homocigotos y heterocigotos. Para detectar la presencia de los alelos nulos y evaluar los errores en las muestras analizadas para cada locus a nivel poblacional se empleó el programa *MicroChecker* v.2.2.3. (Van Oosterhout *et al.* 2004).

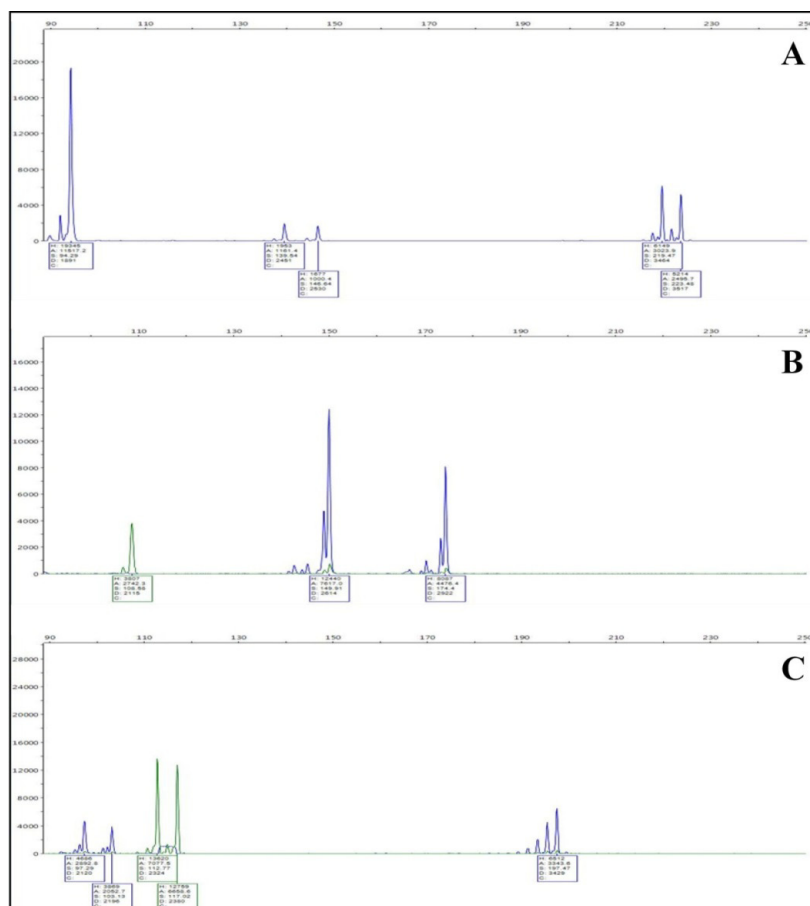


Figura III.2. Electroferogramas obtenidos mediante la técnica de lectura de fragmentos para los loci microsatélites analizados para la Trucha Común. De arriba hacia abajo y de izquierda a derecha: (A) loci Str60INRA (homocigoto 94/94), Str73INRA (heterocigoto 140/146) y Str15INRA (heterocigoto 220/224); (B) loci Ssa85 (homocigoto 108/108) y Ssa197 (heterocigoto 150/174) y (C) loci SSOSL438 (heterocigoto 97/103), BFRO 002 (heterocigoto 113/117) y SSOSL417 (homocigoto 197/197).

III.2.3.2. Introgresión genética

La introgresión genética a nivel nuclear en las localidades estudiadas fue estimada tanto a partir de la frecuencia del alelo exótico *LDH-CI*90*, como por medio del estudio del coeficiente de hibridación o mezcla (q) y de la frecuencia de alelos autóctonos empleando loci microsatélites.

El equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) establece que en una población panmíctica de tamaño infinito, con generaciones discretas, no sometida a migración, mutación o selección; las frecuencias génicas y genotípicas se mantendrán constantes a lo largo del tiempo, permaneciendo la población en equilibrio. Las desviaciones del equilibrio de H-W serán por tanto el producto de la violación de alguna de estas asunciones previas. El ciclo biológico de la Trucha Común implica la coexistencia de varias generaciones en una misma población, incumpliendo una de las premisas del equilibrio de H-W. Sin embargo, asumiendo que todos los genotipos tienen los mismos parámetros poblacionales, las frecuencias alélicas se acercarán asintóticamente a valores constantes que son independientes del sexo o la edad, convergiendo la población a un estado de equilibrio de H-W en generaciones (Charlesworth 1994). Las poblaciones estudiadas ocuparon sus actuales distribuciones hace cientos de generaciones, por lo que cabe suponer que han alcanzado este estado de equilibrio poblacional.

En primer lugar, el posible desvío del equilibrio de H-W del locus *LDH-CI** se analizó por medio de un test de probabilidad exacto implementado en el programa *GENEPOP v.4.1* (Rousset 2008). Los valores de heterocigosis observada (H_o) y esperada (H_e) para el locus *LDH-CI** fueron calculados con el programa *GENETIX v.4.05.2* (Belkhir *et al.* 2004). Si no existiera cruzamiento al azar, la frecuencia de heterocigotos observados en la población sería distinta a la esperada en equilibrio. Para un locus dado, la desviación observada se expresó mediante el índice de endogamia F_{IS} (Weir y Cockerham 1984) calculado con el programa *GENETIX v.4.05.2*. Las frecuencias genotípicas y alélicas entre los ríos de cada cuenca y entre cuencas para el locus *LDH-CI** fueron comparadas mediante análisis de la varianza (ANOVA) empleando el programa *STATISTICA v.8.* (Statsoft 2002). En aquellos casos en los que se detectaron diferencias significativas, se compararon las medias analizadas *a posteriori* empleando los procedimientos de Tukey-Kramer modificado para tamaños muestrales distintos (*Unequal N HSD*, Spjøtvoll y Stoline 1973) y Bonferroni, adoptando un nivel de significación estadística de $p < 0,05$. La homogeneidad de la varianza y la distribución normal de los datos se comprobaron mediante las pruebas de Levene (Levene 1960) y Shapiro-Wilk (Shapiro *et al.* 1968), respectivamente.

Por otro lado, se realizó una evaluación de la evolución de la introgresión genética del alelo *LDH-CI** en 16 ríos pertenecientes a todas las cuencas analizadas en un periodo que oscila entre cuatro y diez años aproximadamente. Como datos comparativos fueron considerados los valores de introgresión obtenidos para este locus por otros autores en estudios previos (García-Marín 1992, Doadrio *et al.* 1996b, García-Marín y Pla 1996, Sanz *et al.* 2002, Machordom 2003).

Finalmente, para comparar el efecto de las repoblaciones con distintos marcadores genéticos, fue analizada la frecuencia de alelos alóctonos de microsatélites y estimado el grado de introgresión de genes de repoblación en cada uno de los ejemplares a través del coeficiente de hibridación o mezcla q generado por el programa *STRUCTURE* v.2.3.3. (Pritchard *et al.* 2000). Este coeficiente mide la proporción del genoma de un individuo que pertenece a la población nativa original, siendo la distribución de los valores de q (rango 0-1) informativa de la presencia de genes de origen alóctono. Si q es próximo a 1 (rango de q 1,000-0,990) se considera un ejemplar de genotipo nativo, si se encuentra en un rango entre 0,989 y 0,900, la muestra está moderadamente mezclada con trucha exótica; si presenta un rango entre 0,899 y 0,101, el individuo presenta unos niveles de introgresión genética muy elevados; mientras que valores de q próximos a 0 (rango de q 0-0,100) es indicativo de muestras que presentan un origen foráneo. Este coeficiente fue calculado considerando un modelo de hibridación o mezcla entre dos poblaciones, una nativa y otra exótica, forzando a que el programa incluya a todos los individuos exóticos como no híbridos (Hansen y Mensberg 2009). Fue definido un modelo de frecuencias alélicas independientes debido a que las frecuencias de la población nativa no darán información sobre la distribución alélica de la población exótica, y viceversa. Para validar los resultados obtenidos para el parámetro q a nivel individual, fueron aplicadas 30.000 interacciones para el “burnin period” seguidos de 1.000.000 de interacciones adicionales (*number of Markov chain Monte Carlo*, MCMC). Como población de referencia alóctona, fueron utilizados los resultados obtenidos para los ocho loci en 60 truchas centroeuropeas procedentes de piscifactoría.

III.3. RESULTADOS

III.3.1. Introgresión genética en el conjunto de las poblaciones

El análisis del locus *LDH-CI** reveló la existencia de dos alelos diferentes: *LDH-CI**90 y *LDH-CI**100 (Tablas III.2 a III.5). El alelo *LDH-CI**90, principal indicador de la presencia de ejemplares de repoblación o de sus descendientes presentó una frecuencia media global de 20%, siendo detectado en 636 ejemplares, incluyendo los híbridos, lo que representó un 32% del total.

La variante alélica *LDH-CI**90 fue encontrada en el 85% de los ríos analizados (Tablas III.3), oscilando la introgresión media por río entre 0 y 90%. La presencia de marcadores de repoblación fue variable. De hecho, el 18% de los ríos mostraron valores moderados (menores del 10%), el 30% alcanzó frecuencias altas comprendidas entre 10 y 30%, existiendo un 37% de los ríos con valores de introgresión severos (mayores del 30%). Un 61% de los cursos mostraron individuos homocigotos para el alelo *LDH-CI**90, oscilando en estos ríos la frecuencia del genotipo *LDH-CI**90/90 entre 2 y 80%. Cuando se realizó el análisis a nivel de localidad se detectó introgresión por material genético alóctono en 70% de las localidades analizadas (Tablas III.4 y III.5), variando entre 0 y 100%. El 18% de las localidades mostró valores de introgresión moderados, el 18% frecuencias altas y el 33% restante unos niveles de introgresión severos. Cabe destacar que 37 localidades presentaron ejemplares homocigotos

para el alelo *LDH-CI*90*. La mayor parte de estas localidades exhibieron los valores más altos de introgresión registrados, variando en estas localidades la frecuencia del genotipo *LDH-CI*90/90* entre 4 y 100%. No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias observadas y esperadas por el equilibrio de Hardy-Weinberg en el locus *LDH-CI**, salvo en dos localidades pertenecientes a los ríos Andarax y Poqueira.

El nivel de introgresión nuclear diagnosticado con el locus *LDH-CI** fue significativamente superior en las cuencas mediterráneas en comparación con la cuenca del Guadalquivir (*ANOVA*, $F_{1,91} = 4,990$, $p < 0,001$). Además, el número de individuos homocigotos para el alelo diagnóstico fue significativamente mayor en las cuencas mediterráneas (*ANOVA*, $F_{1,91} = 3,343$, $p < 0,01$).

III.3.1.1. Introgresión genética en la cuenca del Guadalquivir

La presencia de ejemplares alóctonos en la cuenca del Guadalquivir fue muy variable (Tablas III.2 a III.4), alcanzando el alelo *LDH-CI*90* un valor medio del 9%. Esta variante fue detectada en 286 ejemplares, incluyendo los híbridos, lo que representa un 18,5% del total. El alelo diagnóstico *LDH-CI*90* se encontró en el 74% de los ríos analizados, oscilando su frecuencia entre el 0 y 90% (Tabla III.3). De ellos, el 26% mostró valores leves o moderados de introgresión genética, el 32% alcanzó frecuencias altas, existiendo un 16% con niveles de introgresión severos. Con respecto a los genotipos encontrados, un 42% de los ríos presentaron ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-CI*90*, variando entre el 6 y 90% (Tabla III.3). Se detectó introgresión por material genético alóctono en 49% de las localidades, variando la frecuencia media entre 0 y 90% (Tabla III.4). El 18% de los ríos mostró niveles de introgresión moderados, el 16% frecuencias altas, presentado un 16% valores de introgresión severos (Figura III.3). Aunque el porcentaje de ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-CI*90* fue bajo (Tabla III.2), un 57% de las localidades presentaron frecuencias próximas o superiores al 10%, oscilando dentro de estas localidades entre 2 y 80% (Tabla III.4).

El nivel de introgresión genética fue muy variable entre las distintas cuencas del Guadalquivir, mostrando diferencias significativas tanto al comparar las frecuencias del alelo *LDH-CI*90* (*ANOVA*, $F_{3,47} = 10,597$, $p < 0,001$) como la proporción de genotipos homocigotos para esta variante foránea (*ANOVA*, $F_{3,47} = 28,269$, $p < 0,001$). De hecho, el nivel de introgresión nuclear en ambos casos fue superior en la cuenca del Guadalimar (Tabla III.2), mostrando diferencias significativas con el resto de cuencas en todas las comparaciones múltiples *a posteriori* realizadas.

Tabla III.2. Frecuencia media (%) y rango del alelo diagnóstico *LDH-CI** entre las localidades de estudio en las cuencas del sur de la Península Ibérica. En la tabla se incluye el número de localidades (N_{loc}) y de truchas analizadas (N_{ind}), así como el porcentaje de ejemplares de cada uno de los genotipos encontrados.

Cuenca	N_{loc}	N_{ind}	<i>LDH-CI*90</i>	Min-Max	*90/90	*90/100	*100/100
Alto Guadalquivir	14	265	11,13	0,00-64,29	3,77	14,72	81,51
Guadiana Menor	13	294	12,59	0,00-56,67	4,42	16,33	79,25
Guadalimar	1	5	90,00	90,00	80,00	20,00	0,00
Genil	23	495	4,24	0,00-42,11	0,61	7,27	92,12
Cuenca del Guadalquivir	51	1059	8,69	0,00-90,00	2,83	11,71	85,46
Guadalfeo	16	436	35,55	1,67-64,81	14,91	41,28	43,81
Adra	8	147	57,82	17,65-97,50	40,14	35,37	24,49
Andarax	4	83	19,88	5,17-100,00	10,84	18,07	71,09
Segura	14	274	21,90	0,00-69,57	6,57	30,66	62,77
Cuencas mediterráneas	43	940	33,67	0,00-100,00	15,65	35,79	48,56
Total	93	1999	20,44	0,00-100,00	9,06	22,76	68,18

Tabla III.3. Frecuencia media (%) y rango del alelo diagnóstico *LDH-CI*90* dentro de los ríos del sur de la Península Ibérica. En la tabla se incluye el número de localidades (N_{loc}) y de truchas analizadas (N_{ind}), así como el porcentaje de ejemplares de cada uno de los genotipos encontrados.

Cuenca	Río	N_{loc}	N_{ind}	<i>LDH-CI*90</i>	Min-Max	*90/90	*90/100	*100/100
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	3	25	28,00	22,73-33,33	8,00	40,00	52,00
Alto Guadalquivir	Borosa	4	70	14,29	0,00-55,00	8,57	11,43	80,00
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	3	86	2,33	0,00-5,56	0,00	4,65	95,35
Alto Guadalquivir	Guadalquivir II	2	50	11,00	8,70-12,96	0,00	22,00	78,00
Alto Guadalquivir	Aguascebas	2	34	14,71	1,85-64,29	40,00	30,00	30,00
Guadiana Menor	Guardal	1	24	31,25	31,25	12,50	37,50	50,00
Guadiana Menor	Castril	2	55	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Guadiana Menor	Guadalentín	4	118	11,86	0,00-38,33	5,08	13,56	81,36
Guadiana Menor	Ayo. del Pueblo	1	9	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Guadiana Menor	Alhorí	3	32	37,50	0,00-56,67	12,50	50,00	37,50
Guadiana Menor	Fardes	2	56	6,250	0,00-12,96	0,00	12,50	87,50
Guadalimar	Guadalimar	1	5	90,00	90,00	80,00	20,00	0,00
Genil	Genil	4	83	9,040	0,00-24,00	0,00	18,07	81,93
Genil	Maitena	3	93	0,540	0,00-1,72	0,00	1,08	98,92
Genil	Aguas Blancas	1	28	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Monachil	1	29	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Dílar	1	30	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Cacín	12	203	4,68	0,00-42,11	1,48	6,40	92,12
Genil	Alhama	1	29	12,07	12,07	0,00	24,14	75,86
Guadalfeo	Grande de Bérchules	3	71	50,00	39,66-62,07	22,54	54,93	22,54
Guadalfeo	Trevélez	4	113	37,61	1,67-64,81	18,58	38,05	43,36
Guadalfeo	Poqueira	3	86	35,47	9,09-57,41	17,44	36,05	46,51
Guadalfeo	Chico de Soportújar	2	57	35,09	32,76-37,5	10,53	49,12	40,35
Guadalfeo	Lanjarón	2	57	4,39	3,57-5,17	0,00	8,77	91,23
Guadalfeo	Torrente	2	52	46,15	45,45-47,37	13,46	65,38	21,15
Adra	Paterna	2	14	85,71	83,33-90,00	71,43	28,57	0,00
Adra	Bayárcal	4	86	36,63	17,65-58,93	13,95	45,35	40,70
Adra	Mecina	2	47	88,30	81,48-97,50	78,72	19,15	2,13
Andarax	Andarax	4	84	19,88	5,17-100,00	10,84	18,07	71,08
Segura	Segura	4	89	14,04	0,00-19,64	0,00	28,09	71,91
Segura	Madera	3	59	39,83	4,76-69,57	25,42	28,81	45,76
Segura	Zumeta	3	58	12,93	5,90-50,00	1,72	22,41	75,86
Segura	Tus	4	68	24,26	0,00-36,36	2,94	42,65	54,41

III. Introgresión genética en el sur de la Península Ibérica

Tabla III.4. Frecuencia media (%) del alelo diagnóstico *LDH-C1*90* por localidad en la cuenca del Guadalquivir. En la tabla se incluye para cada localidad el número de truchas analizadas (N_{ind}), así como el porcentaje de ejemplares de cada uno de los genotipos encontrados.

Cuenca	Río	Localidad	N_{ind}	<i>LDH-C1*90</i>	*90/90	*90/100	*100/100
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	GU1	11	22,73	0,00	45,45	54,55
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	GU2	12	33,33	16,67	33,33	50,00
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	GU3	2	25,00	0,00	50,00	50,00
Alto Guadalquivir	Borosa	BO1	10	55,00	40,00	30,00	30,00
Alto Guadalquivir	Borosa	BO2	29	0,00	0,00	0,00	100,00
Alto Guadalquivir	Borosa	BO3	21	21,43	9,52	23,81	66,67
Alto Guadalquivir	Borosa	BO4	10	0,00	0,00	0,00	100,00
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	AG1	30	0,00	0,00	0,00	100,00
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	AG2	29	1,72	0,00	3,45	96,55
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	AG3	27	5,56	0,00	11,11	88,89
Alto Guadalquivir	Guadalquivir II	GU4	27	12,96	0,00	25,93	74,07
Alto Guadalquivir	Guadalquivir II	GU5	23	8,70	0,00	17,39	82,61
Alto Guadalquivir	Aguascebas	AC1	7	64,29	28,57	71,43	0,00
Alto Guadalquivir	Aguascebas	AC2	27	1,85	0,00	3,70	96,30
Guadiana Menor	Guardal	GR1	24	31,25	12,50	37,50	50,00
Guadiana Menor	Castril	CS1	27	0,00	0,00	0,00	100,00
Guadiana Menor	Castril	CS2	28	0,00	0,00	0,00	100,00
Guadiana Menor	Guadalentín	GD1	30	38,33	20,00	36,67	43,33
Guadiana Menor	Guadalentín	GD2	29	8,62	0,00	17,24	82,76
Guadiana Menor	Guadalentín	GD3	29	0,00	0,00	0,00	100,00
Guadiana Menor	Guadalentín	GD4	30	0,00	0,00	0,00	100,00
Guadiana Menor	Ayo. del Pueblo	PU1	9	0,00	0,00	0,00	100,00
Guadiana Menor	Alhorí	AH1	2	0,00	0,00	0,00	100,00
Guadiana Menor	Alhorí	AH2	15	23,33	0,00	46,67	53,33
Guadiana Menor	Alhorí	AH3	15	56,67	26,67	60,00	13,33
Guadiana Menor	Fardes	FA1	27	12,96	0,00	25,93	74,07
Guadiana Menor	Fardes	FA2	29	0,00	0,00	0,00	100,00
Guadalimar	Guadalimar	GL1	5	90,00	80,00	20,00	0,00
Genil	Genil	GE1	14	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Genil	GE2	17	2,94	0,00	5,88	94,12
Genil	Genil	GE3	25	24,00	0,00	48,00	52,00
Genil	Genil	GE4	27	3,70	0,00	7,41	92,59
Genil	Maitena	MA1	35	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Maitena	MA2	29	1,72	0,00	3,45	96,55
Genil	Maitena	MA3	29	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Aguas Blancas	AB1	28	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Monachil	MO1	29	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Dílar	DI1	30	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Cacín	CA1	30	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Cacín	CA2	13	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Cacín	CA3	34	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Cacín	CA4	1	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Cacín	CA5	8	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Cacín	CA6	1	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Cacín	CA7	1	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Cacín	CA8	25	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Cacín	CA9	23	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Cacín	CA10	31	4,84	0,00	9,68	90,32
Genil	Cacín	CA11	17	0,00	0,00	0,00	100,00
Genil	Cacín	CA12	19	42,11	15,79	52,63	31,58
Genil	Alhama	AL1	29	12,07	0,00	24,14	75,86

Tabla III.5. Frecuencia media (%) del alelo diagnóstico *LDH-CI*90* por localidad en las cuencas mediterráneas del sur de la Península Ibérica. En la tabla se incluye para cada localidad el número de truchas analizadas (N_{ind}), así como el porcentaje de ejemplares de cada uno de los genotipos encontrados.

Cuenca	Río	Localidad	N_{ind}	<i>LDH-CI*90</i>	*90/90	*90/100	*100/100
Guadalfeo	Grande de Bérchules	CB1	29	62,07	34,48	55,17	10,34
Guadalfeo	Grande de Bérchules	GB1	13	46,15	15,38	61,54	23,08
Guadalfeo	Grande de Bérchules	GB2	29	39,66	13,79	51,72	34,48
Guadalfeo	Trevélez	TR1	30	1,67	0,00	3,33	96,67
Guadalfeo	Trevélez	TR2	28	44,64	25,00	39,29	35,71
Guadalfeo	Trevélez	TR3	28	42,86	14,29	57,14	28,57
Guadalfeo	Trevélez	TR4	27	64,81	37,04	55,56	7,41
Guadalfeo	Poqueira	PO1	33	9,09	9,09	0,00	90,91
Guadalfeo	Poqueira	PO2	27	57,41	25,93	62,96	11,11
Guadalfeo	Poqueira	PO3	26	46,15	19,23	53,85	26,92
Guadalfeo	Chico de Soportújar	CH1	28	37,50	14,29	46,43	39,29
Guadalfeo	Chico de Soportújar	CH2	29	32,76	6,90	51,72	41,38
Guadalfeo	Lanjarón	LA1	28	3,57	0,00	7,14	92,86
Guadalfeo	Lanjarón	LA2	29	5,17	0,00	10,34	89,66
Guadalfeo	Torrente	TO1	33	45,45	12,12	66,67	21,21
Guadalfeo	Torrente	TO2	19	47,37	15,79	63,16	21,05
Adra	Paterna	PA1	9	83,33	66,67	33,33	0,00
Adra	Paterna	PA2	5	90,00	80,00	20,00	0,00
Adra	Bayárcal	BA1	17	17,65	0,00	35,29	64,71
Adra	Bayárcal	BA2	13	26,92	7,69	38,46	53,85
Adra	Bayárcal	BA3	28	58,93	32,14	53,57	14,29
Adra	Bayárcal	BA4	28	30,36	7,14	46,43	46,43
Adra	Mecina	ME1	27	81,48	66,67	29,63	3,70
Adra	Mecina	ME2	20	97,50	95,00	5,00	0,00
Andarax	Andarax	AN1	4	100,00	100,00	0,00	0,00
Andarax	Andarax	AN2	30	5,17	0,00	10,34	89,66
Andarax	Andarax	AN3	29	18,97	10,34	17,24	72,41
Andarax	Andarax	AN4	21	26,19	9,52	33,33	57,14
Segura	Segura	SE1	28	19,64	0,00	39,29	60,71
Segura	Segura	SE2	29	15,52	0,00	31,03	68,97
Segura	Segura	SE3	28	8,93	0,00	17,86	82,14
Segura	Segura	SE4	4	0,00	0,00	0,00	100,00
Segura	Madera	MD1	21	4,76	0,00	9,52	90,48
Segura	Madera	MD2	23	69,57	52,17	34,78	13,04
Segura	Madera	MD3	15	43,33	20,00	46,67	33,33
Segura	Zumeta	ZU1	29	6,90	0,00	13,79	86,21
Segura	Zumeta	ZU2	28	17,86	3,57	28,57	67,86
Segura	Zumeta	ZU3	1	50,00	0,00	100,00	0,00
Segura	Tus	TU1	1	0,00	0,00	0,00	100,00
Segura	Tus	TU2	11	36,36	9,09	54,55	36,36
Segura	Tus	TU3	27	24,07	3,70	40,74	55,56
Segura	Tus	TU4	29	20,69	0,00	41,38	58,62

La cuenca del Alto Guadalquivir mostró un valor de introgresión elevado (11%), encontrándose el alelo *LDH-CI*90* en el 18,5% de las truchas analizadas. Los ríos pertenecientes a esta cuenca exhibieron una introgresión media (20% de los ríos) o alta (80% de los ríos), oscilando entre 2 y 28% (Tabla III.3). Además, el 60% de los ríos presentaron ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-CI*90*, variando su frecuencia entre 8 y 40% (Tabla III.3). A nivel de localidad, un 79% mostraron el alelo diagnóstico, oscilando entre 0 y 64% (Tabla III.4). Un 29% presentó valores de introgresión moderados, el 29% altos, mientras que el 21% exhibió valores severos (Figura III.3). Cabe destacar que cuatro localidades mostraron individuos homocigotos para el alelo *LDH-CI*90*, oscilando la frecuencia de este genotipo entre 9,5 y 40% (Tabla III.4). A pesar de presentar ríos con altos niveles de introgresión y otros libres de material genético alóctono, no se detectaron diferencias significativas al comparar tanto la frecuencia de alelos exóticos (*ANOVA*, $F_{4,8} = 0,850$, $p > 0,05$) como la proporción del genotipo *LDH-CI*90/90* (*ANOVA*, $F_{4,8} = 0,636$, $p > 0,05$). Por último, el nivel de introgresión nuclear fue significativamente superior aguas arriba del embalse de Tranco en comparación con las localidades situadas aguas abajo (*ANOVA*, $F_{1,3} = 13,221$, $p < 0,05$), mostrando el alelo *LDH-CI*90* una frecuencias medias de 27 y 11%, respectivamente.

La cuenca del Guadiana Menor alcanzó un valor de introgresión elevado, encontrándose el alelo *LDH-CI*90* en 21% de los ejemplares. De este modo, el 67% de los ríos presentaron introgresión por material genético alóctono, oscilando la frecuencia media de esta variante foránea entre 0 y 37,5% (Tabla III.3). El 17% mostró valores leves de introgresión genética, el 17% alcanzó frecuencias altas, existiendo un 33% de los ríos con niveles de introgresión severos. Además, el 50% de los ríos presentaron ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-CI*90*, variando la frecuencia del genotipo *LDH-CI*90/90* entre 5 y 12,5% (Tabla III.3). A nivel de localidad, un 46% mostraron el alelo diagnóstico, oscilando la introgresión entre 0 y 57% (Tabla III.4). Un 8% de los ríos presentó valores de introgresión moderados, el 15% altos, mientras que el 23% restante mostró valores de introgresión severos (Figura III.3). En relación a la presencia de ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-CI*90*, tres localidades mostraron el genotipo *LDH-CI*90/90* en su curso, oscilando su frecuencia entre 12,5 y 27% (Tabla III.4). En la cuenca del Guadiana Menor se alcanzó un valor de introgresión elevado, no detectándose diferencias entre los ríos analizados, tanto al ser comparada la frecuencia del alelo *LDH-CI*90* (*ANOVA*, $F_{5,7} = 0,774$, $p > 0,05$) como en la proporción de genotipo alóctono (*ANOVA*, $F_{5,7} = 0,405$, $p > 0,05$).

La localidad analizada de la cuenca Guadalimar presentó un nivel elevado de introgresión genética (superior al 30%), con una frecuencia de homocigotos para el alelo diagnóstico del 80%.

Finalmente, la cuenca del Genil presentó una frecuencia media del alelo *LDH-CI*90* moderada (4%), siendo detectada la variante alóctona en 8% de los ejemplares. En términos generales, los ríos analizados dentro de esta cuenca presentaron un nivel de introgresión bajo, oscilando entre 0 y 12% (Tabla III.3). Así, el 43% mostró valores de introgresión moderados, mientras que el 14% presentó frecuencias altas. Además, un único río presentó ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-CI*90*, con una frecuencia del 2%. A nivel de localidad, un

30% mostraron el alelo diagnóstico, oscilando la introgresión estimada entre 0 y 42% (Tabla III.4). Un 17% mostró valores de introgresión moderados, 9% altos, mientras que en 4% los niveles fueron severos (Figura III.3). Cabe destacar que una única localidad presentó individuos homocigotos para el alelo *LDH-C1*90*, presentando una frecuencia del 15%. Dentro de la cuenca del Genil no se detectaron diferencias significativas al comparar la frecuencia de alelos exóticos (*ANOVA*, $F_{6,16} = 0.272$, $p > 0,05$) y la proporción del genotipo homocigoto para la variante *LDH-C1*90* (*ANOVA*, $F_{6,16} = 0,116$, $p > 0,05$).

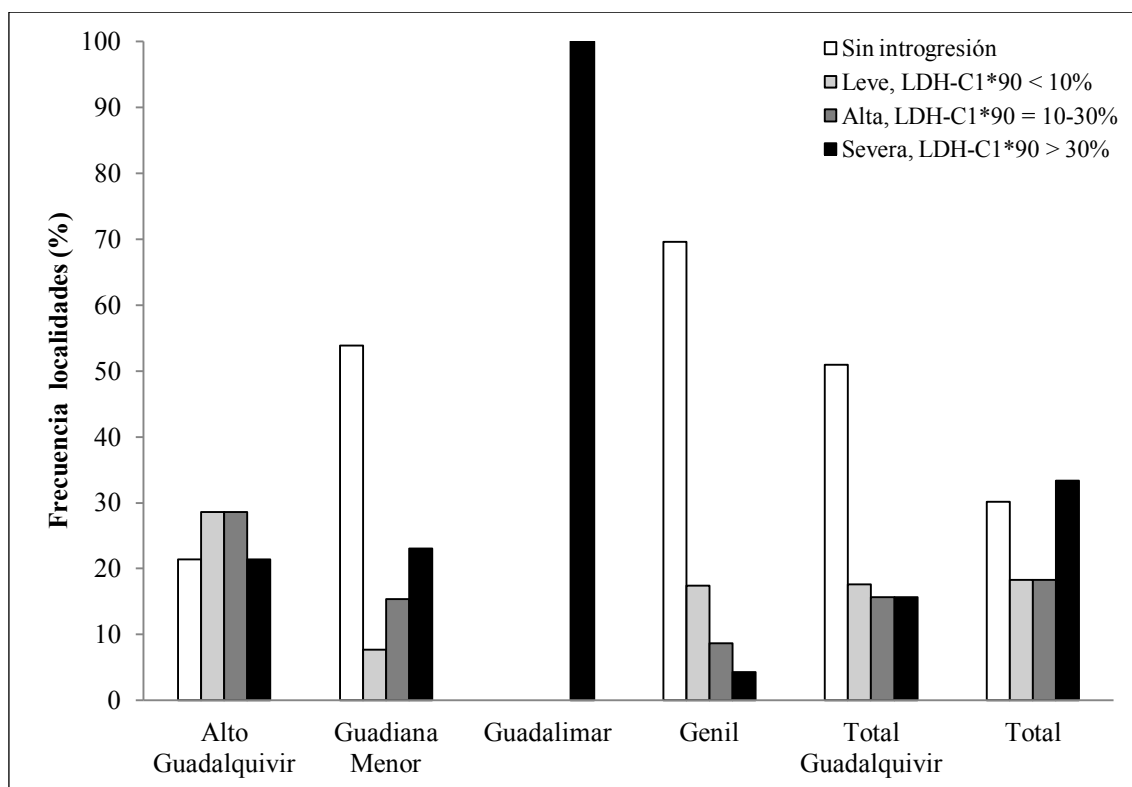


Figura III.3. Frecuencia de localidades (%) para cada nivel de introgresión en las cuencas del Guadalquivir y en la totalidad de localidades analizadas.

III.3.1.2. Introgresión genética en las cuencas mediterráneas

La presencia de ejemplares alóctonos en las cuencas mediterráneas fue muy variable (Tabla III.2, III.3 y III.5), alcanzando el alelo *LDH-C1*90* un valor medio del 34%. Esta variante fue detectada en 447 ejemplares, incluyendo los híbridos, lo que representó un 48% del total. El alelo diagnóstico *LDH-C1*90* se detectó en el 100% de los ríos analizados, oscilando su frecuencia entre el 0 y el 88% (Tabla III.3). De hecho, el 7% mostró valores leves de introgresión genética, el 29% alcanzó frecuencias altas, existiendo un 64% con valores severos. El porcentaje de ejemplares homocigotos fue igualmente elevado (Tabla III.3), exhibiendo un 86% de los ríos frecuencias del genotipo *LDH-C1*90/90* entre 2 y 79%. En relación a las localidades estudiadas en la vertiente mediterránea, el 95% presentaron introgresión por material genético alóctono, variando la frecuencia media del alelo *LDH-C1*90* entre 0 y 100% (Tabla III.5). El 19% de las localidades mostró valores de introgresión moderados, el 21%

frecuencias altas, mientras que un 55% de las localidades presentó valores de introgresión severos (Figura III.4). Además, un 67% de las localidades presentaron ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-CI*90*, variando su frecuencia entre 3,5 y 100% (Tabla III.5).

El nivel de introgresión genética fue muy variable entre las distintas cuencas mediterráneas, mostrando diferencias significativas tanto al comparar las frecuencias del alelo *LDH-CI*90* (*ANOVA*, $F_{3,38} = 3,839$, $p < 0,05$) como la proporción de genotipos homocigotos para la variante foránea (*ANOVA*, $F_{3,38} = 4,939$, $p < 0,01$). De hecho, el nivel de introgresión nuclear en ambos casos fue superior en la cuenca del Adra (Tabla III.2), mostrando diferencias significativas con el resto de cuencas cotejadas en todas las comparaciones múltiples *a posteriori* realizadas.

La cuenca del Guadalfeo mostró un nivel de introgresión elevado (35,6%), encontrándose el alelo *LDH-CI*90* en el 56% de las truchas analizadas. Salvo el río Lanjarón, que presentó un nivel de introgresión del 4%, todos los cursos estudiados exhibieron un nivel de introgresión severo, que osciló entre 35 y 50% (Tabla III.3). Además, el 83% de los ríos presentaron ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-CI*90*, variando la frecuencia de este genotipo entre 10,5 y 22,5% (Tabla III.3). Al realizar el estudio a nivel de localidad, se observó que todas las localidades de la cuenca mostraron el alelo diagnóstico *LDH-CI*90*, oscilando la introgresión entre 2 y 65% (Tabla III.5). Un 25% presentó valores de introgresión moderados, mientras que el 75% restante mostraron valores severos (Figura III.4). Cabe destacar que el 81% de las localidades mostraron individuos homocigotos para el alelo *LDH-CI*90*, oscilando la frecuencia de este genotipo entre 7 y 37% (Tabla III.5). No se detectaron diferencias significativas al comparar la frecuencia de alelos exóticos (*ANOVA*, $F_{5,10} = 1,515$, $p > 0,05$) y la proporción del genotipo *LDH-CI*90/90* (*ANOVA*, $F_{5,10} = 1,182$, $p > 0,05$). Por último, se observó una tendencia al aumento de la introgresión desde los tramos más altos de los ríos Poqueira y Trevélez, con valores inferiores al 10%, a los tramos bajos, que mostraron un nivel de introgresión severo cercano al 50%.

La cuenca del Adra presentó una alta introgresión por material genético alóctono, encontrándose el alelo *LDH-CI*90* en el 75,6% de ejemplares. De hecho, todos los ríos analizados en esta cuenca mostraron unos niveles de introgresión severos, oscilando la frecuencia media de la variante foránea entre 37 y 88% (Tabla III.3). Además, todos los ríos presentaron ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-CI*90*, variando su frecuencia entre 14 y 79% (Tabla III.3). Igualmente, todas las localidades mostraron el alelo diagnóstico, oscilando la introgresión estimada entre 18 y 97,5% (Tabla III.5). Un 12,5% presentó valores de introgresión altos, mientras que el 87,5% restante mostró valores severos (Figura III.4). En relación a la presencia de ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-CI*90*, siete localidades mostraron el genotipo *LDH-CI*90/90*, oscilando su frecuencia entre 7 y 95% (Tabla III.5). En la cuenca del Adra los alelos exóticos no se distribuyeron homogéneamente entre los ríos analizados, detectándose diferencias significativas tanto al comparar la frecuencia del alelo *LDH-CI*90* (*ANOVA*, $F_{2,5} = 13,555$, $p < 0,01$), como la proporción del genotipo alóctono *LDH-CI*90/90* (*ANOVA*, $F_{2,5} = 19,860$, $p < 0,01$). En ambos casos, las comparaciones múltiples *a*

posteriori mostraron diferencias significativas al comparar el río Bayárcal, con los niveles de introgresión más bajos detectados en la cuenca (Tabla III.3), con el resto de cursos fluviales.

La cuenca del Andarax mostró un valor de introgresión elevado (20%), encontrándose el alelo *LDH-C1*90* en el 29% de los ejemplares. La introgresión estimada a partir de la variante *LDH-C1*90* presentó una gran variabilidad entre las localidades de estudio, oscilando entre 5 y 100% (Tabla III.5). De esta manera, el 25% mostró valores de introgresión moderados, el 50% altos, mientras que el 25% restante mostró frecuencias severas (Figura III.4). Además, el 75% de las localidades presentaron ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-C1*90*, variando la frecuencia de este genotipo en estas localidades entre 9,5 y 100% (Tabla III.5).

Finalmente, la cuenca del Segura presentó unos niveles de introgresión por material genético alóctono elevados (22%), detectándose el alelo diagnóstico en el 37% de las truchas analizadas. Todos los cursos estudiados en esta cuenca exhibieron un nivel de introgresión superior al 10%, oscilando entre 14 y 40% (Tabla III.3). De esta manera, el 75% mostró valores de introgresión altos, mientras que el 25% restante mostró frecuencias severas. Además, el 75% de los ríos presentaron ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-C1*90*, variando su frecuencia entre 2 y 25% (Tabla III.3). Al llevar a cabo el estudio a nivel de localidad, se observó que un 86% mostraron el alelo alóctono *LDH-C1*90*. Los niveles de introgresión fueron muy variables, oscilando entre 0 y 70% (Tabla III.5). Un 21% presentó valores de introgresión moderados, el 36% altos, mientras que el 29% restante mostró valores severos (Figura III.4). Cabe destacar que cinco localidades mostraron individuos homocigotos para el alelo *LDH-C1*90*, oscilando su frecuencia entre 4 y 52% (Tabla III.5). Dentro de la cuenca del Segura no se detectaron diferencias significativas al comparar tanto la frecuencia del alelo exótico (*ANOVA*, $F_{3,10} = 1,159$, $p > 0,05$) como la proporción del genotipo *LDH-C1*90/90* (*ANOVA*, $F_{3,10} = 2,801$, $p > 0,05$).

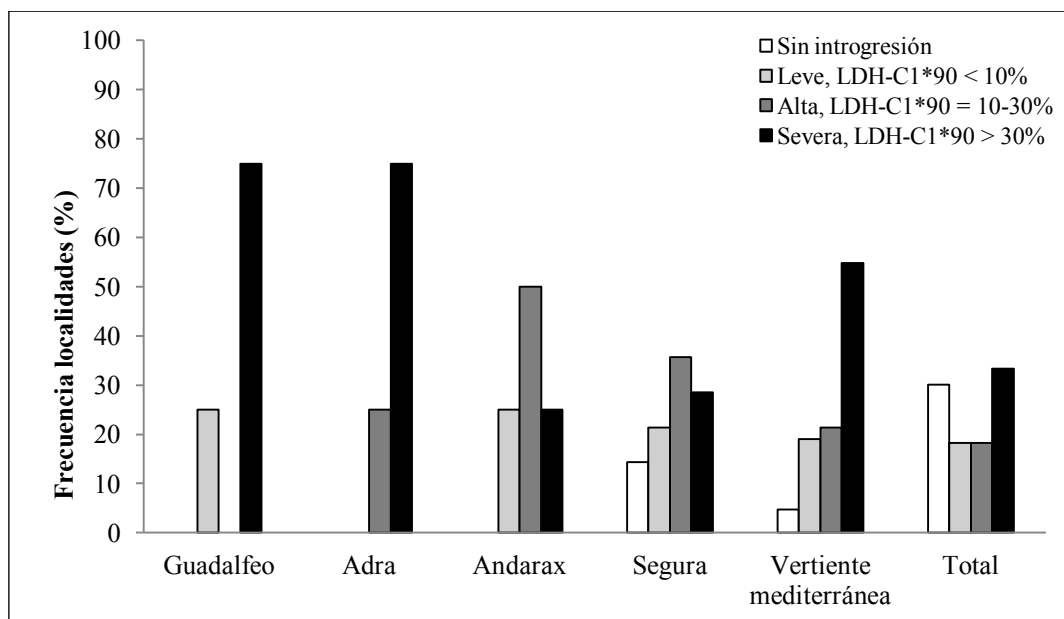


Figura III.4. Frecuencia de localidades (%) para cada nivel de introgresión en las cuencas mediterráneas y en la totalidad de localidades analizadas.

III.3.2. Evolución temporal de la introgresión genética

Al comparar los datos obtenidos en el presente estudio con los valores previos estimados a partir del alelo diagnóstico *LDH-CI*90*, se observa un aumento de la introgresión genética en el 44% de las poblaciones analizadas (Tabla III.6). Además, en las cuencas del Guadalfeo y Adra la frecuencia actual de este alelo fue alta, con valores de 35 y 70%, respectivamente. Por otro lado en los ríos Genil, Grande de Bérchules, Trévez, Torrente, Paterna, Andarax y Tus se observó un aumento de la introgresión en el periodo estudiado, observándose las mayores diferencias en los ríos Grande de Bérchules, Trévez, Paterna, Andarax y Tus. En seis poblaciones (37,5%) se alcanzaron valores similares a lo largo del periodo considerado, mientras que en los ríos Poqueira, Bayárcal y Zumeta se observó una disminución de la introgresión media en el periodo analizado, aunque el valor actual de introgresión genética sigue siendo muy alto.

Tabla III.6. Frecuencia media (%) del alelo diagnóstico *LDH-CI*90* analizados en la presente Tesis (2005-2009) y en estudios anteriores. En la tabla se indica si la introgresión genética ha aumentado (↑), disminuido (↓), ha permanecido similar (≈) o igual (=) a lo largo del periodo analizado.

Cuenca	Río	Código	< 1996	1999	2002	2005-2009		Ref
Guadalquivir	Genil	GE1 a GE4	0	-	-	9,04	↑	4,5
Guadalquivir	Dílar	DI1	0	-	-	0	=	4,5
Guadalfeo	Grande de Bérchules	CB1	-	-	60,00	62,07	≈	2
Guadalfeo	Grande de Bérchules	GB1	-	-	3,30	46,15	↑	2
Guadalfeo	Trévez	TR1 a TR4	-	11,30	-	37,61	↑	3
Guadalfeo	Poqueira	PO1 a PO3	-	28,30	51,70	35,47	↓	2,3
Guadalfeo	Chico de Soportújar	CH1 a CH2	-	39,70	29,30	35,09	≈	2,3
Guadalfeo	Lanjarón	LA1 a LA2	-	5,10	-	4,39	≈	3
Guadalfeo	Torrente	TO1 a TO2	-	-	31,00	46,15	↑	2
Adra	Paterna	PA1 a PA2	54,50	-	-	85,71	↑	1
Adra	Bayárcal	BA4	100	-	-	30,36	↓	1
Adra	Mecina	ME1 a ME2	-	-	97,70	88,30	≈	2
Andarax	Andarax	AN1 a AN4	8,30	-	-	19,88	↑	1
Segura	Madera	MD1	5,00	6,30		4,76	≈	3,4,5
Segura	Zumeta	ZU1 a ZU3	25,00	-	-	12,93	↓	6
Segura	Tus	TU1 a TU4	2,50	-	-	24,26	↑	6

Referencias (Ref): (1) Doadrio *et al.* (1996b), (2) Machordom (2003), (3) Sanz *et al.* (2002), (4) García-Marín (1992), (5) García-Marín y Pla (1996) y (6) Almodóvar *et al.* datos no publicados.

III.3.3. Comparación de marcadores genéticos aplicados al estudio de la introgresión nuclear

El análisis de la introgresión genética empleando microsatélites, junto con el estudio del locus *LDH-C1** y la utilización de muestras de referencia, permitió diferenciar las variantes alélicas de microsatélites indicativas de procedencia alóctona de aquellas de origen nativo, así como las comunes a ambas. De esta manera, el 20% de los 83 alelos detectados pudieron ser asignados como alóctonos, mientras que un 60% fueron exclusivos de truchas con origen nativo (Anexo III). El 73% de las localidades mostraron introgresión por material genético alóctono, detectándose al menos un alelo de origen no nativo en el 44% de las muestras. Los resultados obtenidos a partir del coeficiente q fueron similares, exhibiendo el 73% de las localidades individuos con material genético procedente de truchas repobladas. Sin embargo, el porcentaje de ejemplares asignados como alóctonos o híbridos fue inferior, representando un 31% del total. Por otro lado, el alelo *LDH-C1*90* fue detectado en más de la mitad de las localidades analizadas (66%), mostrando el 31% de las truchas analizadas este alelo foráneo.

La introgresión estimada a partir de las frecuencias alélicas de loci microsatélites osciló entre 0 y 53% (Tablas III.7 y III.8), alcanzando un valor medio del 11%. El nivel de introgresión obtenido empleando el coeficiente q fue similar (10%), fluctuando entre 0 y 99% dependiendo de la localidad estudiada (Tablas III.7 y III.8). Finalmente, el alelo diagnóstico *LDH-C1*90* mostró un rango de introgresión igualmente elevado (entre 0 y 90%, Tablas III.7 y III.8), duplicando la introgresión media obtenida a la encontrada con loci microsatélites (22%). De todas las truchas analizadas, un 4% presentaron genotipos exclusivamente asignados como exóticos (rango de $q= 0,000-0,100$), mostrando el 27% genotipos híbridos entre trucha nativa y exótica (rango de $q= 0,101-0,989$). El locus *LDH-C1** mostró un mayor porcentaje de ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-C1*90* (7%), mientras que el 19% exhibieron genotipos heterocigotos *LDH-C1*90/100*. La presencia de alelos de repoblación para los loci microsatélite varió entre las localidades (Figura III.7). De este modo, el 36% mostraron valores de introgresión inferiores al 10%, el 24% alcanzaron frecuencias alélicas altas comprendidas entre 10 y 30%, exhibiendo un 12% valores de introgresión severos, mayores del 30%. Al ser empleado el alelo diagnóstico *LDH-C1*90*, un 19% de las localidades mostraron un valor de introgresión moderado, el 17% alcanzaron frecuencias altas y un 33% tuvieron valores de introgresión severos.

No se observaron diferencias significativas entre las frecuencias observadas y esperadas por el equilibrio de Hardy-Weinberg en las localidades estudiadas, con las excepciones del río Poqueira para el locus *LDH-C1** y los ríos Fardes, Aguas Blancas, Chico de Bérchules y Madera para los loci microsatélites.

Finalmente, dentro de los ríos que presentaron introgresión, un 36% de localidades mostraron individuos homocigotos para el alelo *LDH-C1*90*, detectándose genotipos exclusivamente exóticos solamente en el 15%, cuando se emplearon loci microsatélites. La introgresión encontrada se debió principalmente a la presencia de ejemplares con genotipo híbrido para ambos marcadores, detectándose en 64 y 66% de las localidades, respectivamente.

Tabla III.7. Frecuencia media del alelo *LDH-C1**90 (%), frecuencia media de alelos de loci microsatélites exóticos (% \pm desviación media) y valor medio del coeficiente de hibridación (*q*) con su intervalo de confianza al 90% asociado (C.I.), en las poblaciones analizadas de las cuencas del Guadalquivir. En la tabla se indica el porcentaje de ejemplares asignados con genotipo nativo, híbrido y exótico, tanto para el análisis del locus *LDH-C1** como para el análisis del coeficiente *q*.

				Microsatélites									
				LDH-C1*									
Cuenca	Río	Código	*90	Genotipo			Alelos Exóticos	q (C.I.)	Genotipo				
				Nativo	Híbrido	Exótico			Nativo	Híbrido	Exótico		
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	GU1	22,73	54,55	45,45	0,00	11,18 ± 0,10	0,946 (0,855-1,000)	63,64	36,36	0,00		
Alto Guadalquivir	Borosa	BO2	0,00	100,00	0,00	0,00	1,07 ± 0,02	0,995 (0,945-1,000)	100,00	0,00	0,00		
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	AG1	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,997 (0,989-1,000)	100,00	0,00	0,00		
Alto Guadalquivir	Aguascebas	AC1	64,29	0,00	71,43	28,57	-	-	-	-	-		
Guadiana Menor	Guardal	GR1	31,25	50,00	37,50	12,50	11,56 ± 0,07	0,923 (0,716-1,000)	20,00	80,00	0,00		
Guadiana Menor	Castril	CS1	0,00	100,00	0,00	0,00	0,22 ± 0,00	0,996 (0,983-1,000)	96,67	3,33	0,00		
Guadiana Menor	Guadalentín	GD3	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,997 (0,984-1,000)	100,00	0,00	0,00		
Guadiana Menor	Ayo, del Pueblo	PU1	0,00	100,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-		
Guadiana Menor	Alhorí	AH1+AH2	20,59	58,82	41,18	0,00	29,48 ± 0,23	0,990 (0,939-1,000)	82,35	17,65	0,00		
Guadiana Menor	Alhorí	AH3	56,67	13,33	60,00	26,67	30,42 ± 0,25	0,979 (0,869-1,000)	55,56	44,44	0,00		
Guadiana Menor	Fardes	FA1	12,96	74,07	25,93	0,00	9,71 ± 0,13	0,977 (0,859-1,000)	53,33	46,67	0,00		
Guadalimar	Guadalimar	GL1	90	0,00	20,00	80,00	-	-	-	-	-		
Genil	Genil	GE1+GE2	1,61	96,77	3,23	0,00	4,53 ± 0,04	0,979 (0,916-1,000)	70,97	29,03	0,00		
Genil	Maitena	MA1	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,997 (0,988-1,000)	100,00	0,00	0,00		
Genil	Aguas Blancas	AB1	0,00	100,00	0,00	0,00	0,22 ± 0,00	0,996 (0,979-1,000)	96,55	3,45	0,00		
Genil	Monachil	MO1	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,997 (0,988-1,000)	100,00	0,00	0,00		
Genil	Dílar	DI1	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,997 (0,989-1,000)	100,00	0,00	0,00		
Genil	Cacín	CA1	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,997 (0,989-1,00)	100,00	0,00	0,00		
Genil	Cacín	CA9	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,997 (0,988-1,000)	100,00	0,00	0,00		
Genil	Cacín	CA11	0,00	100,00	0,00	0,00	0,67 ± 0,01	0,995 (0,974-1,000)	89,47	10,53	0,00		
Genil	Alhama	AL1	12,07	75,86	24,14	0,00	5,59 ± 0,05	0,945 (0,822-0,993)	43,33	56,67	0,00		

Tabla III.8. Frecuencia media del alelo *LDH-CI**90 (%), frecuencia media de alelos de loci microsatélites exóticos (% \pm desviación media) y valor medio del coeficiente de hibridación (*q*) con su intervalo de confianza al 90% asociado (C.I.), en las poblaciones analizadas de las cuencas de la vertiente mediterránea. En la tabla se indica el porcentaje de ejemplares asignados con genotipo nativo, híbrido y exótico, tanto para el análisis del locus *LDH-CI** como para el análisis del coeficiente *q*.

			LDH-CI*			Microsatélites					
Cuenca	Río	Código	%90	Genotipo			Alelos Exóticos	q (C.I.)	Genotipo		
				Nativo	Híbrido	Exótico			Nativo	Híbrido	Exótico
Guadalfeo	Grande de Bérchules	CB1	62,07	10,34	55,17	34,48	18,35 ± 0,17	0,880 (0,682-0,973)	3,33	93,33	3,33
Guadalfeo	Grande de Bérchules	GB1	46,15	23,08	61,54	15,38	31,94 ± 0,21	0,528 (0,282-0,777)	0,00	92,86	7,14
Guadalfeo	Trevélez	TR1	1,67	96,67	3,33	0,00	0,00 ± 0,00	0,996 (0,974-1,000)	100,00	0,00	0,00
Guadalfeo	Poqueira	PO1	9,09	90,91	0,00	9,09	0,00 ± 0,00	0,966 (0,914-1,000)	94,29	5,71	0,00
Guadalfeo	Chico de Sopotújar	CH1	37,5	39,29	46,43	14,29	23,86 ± 0,14	0,822 (0,605-0,955)	6,67	66,67	26,67
Guadalfeo	Lanjarón	LAI	3,57	92,86	7,14	0,00	11,71 ± 0,11	0,974 (0,915-1,000)	79,31	20,69	0,00
Guadalfeo	Torrente	TO1	45,45	21,21	66,67	12,12	24,46 ± 0,16	0,946 (0,714-1,000)	8,57	91,43	0,00
Adra	Paterna	PA1	83,33	0,00	33,33	66,67	46,48 ± 0,21	0,020 (0,000-0,104)	0,00	33,33	66,67
Adra	Bayárcal	BA1+BA2	21,67	60,00	36,67	3,33	2,84 ± 0,02	0,978 (0,951-0,993)	96,77	3,23	0,00
Adra	Mecina	ME1	81,48	3,70	29,63	66,67	52,93 ± 0,19	0,011 (0,000-0,057)	0,00	26,67	73,33
Andarax	Andarax	AN2	5,17	89,66	10,34	0,00	4,13 ± 0,02	0,975 (0,911-1,000)	82,76	17,24	0,00
Segura	Segura	SE1	19,64	60,71	39,29	0,00	16,96 ± 0,19	0,975 (0,878-1,000)	63,33	36,67	0,00
Segura	Madera	MD1	4,76	90,48	9,52	0,00	7,66 ± 0,08	0,986 (0,914-1,000)	26,32	73,68	0,00
Segura	Zumeta	ZU1	6,9	86,21	13,79	0,00	6,91 ± 0,04	0,963 (0,874-0,994))	60,00	40,00	0,00
Segura	Tus	TU1+TU2	33,33	41,67	50,00	8,33	5,91 ± 0,05	0,919 (0,872-0,957)	83,33	16,67	0,00

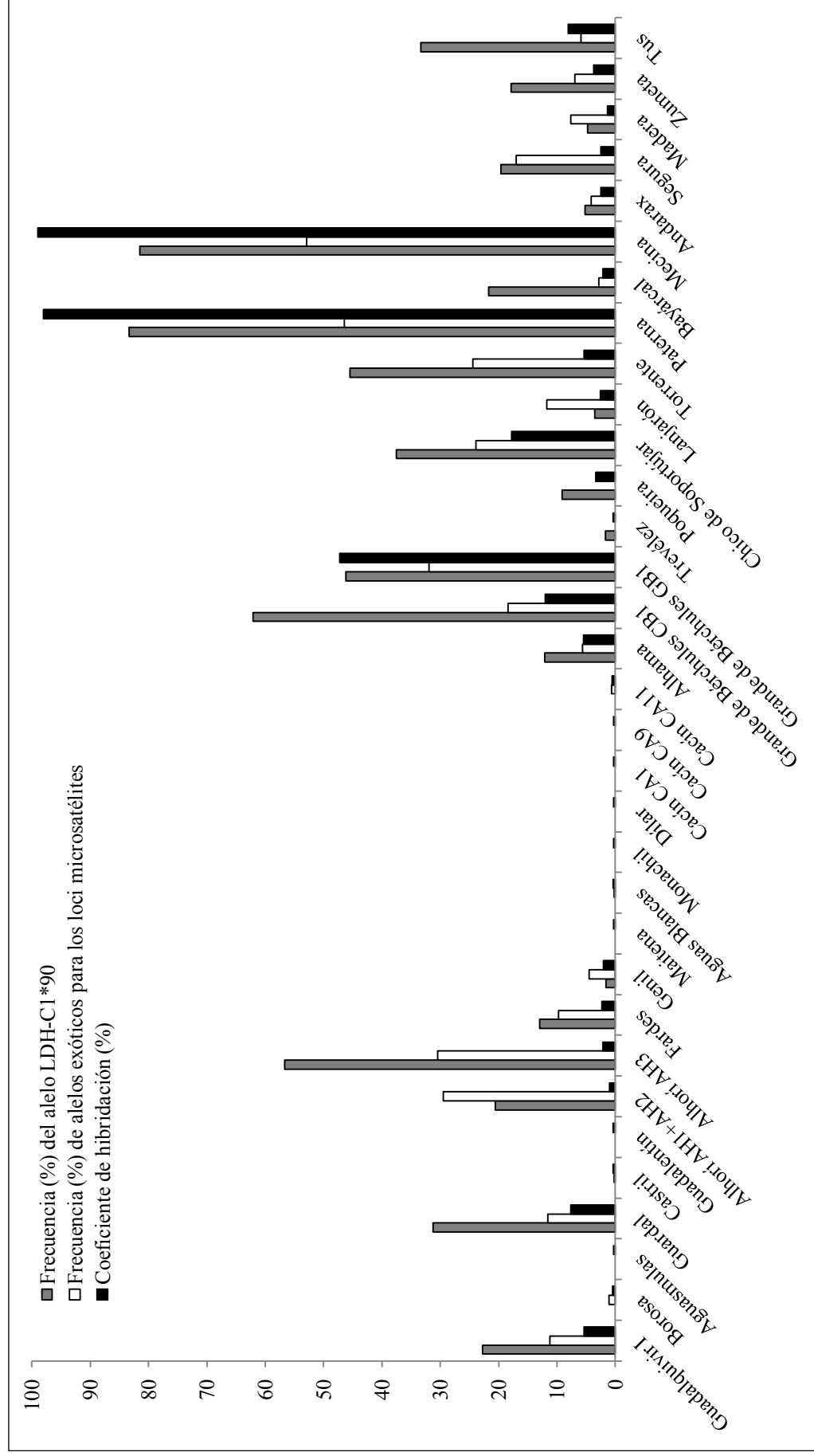


Figura III.7. Frecuencia media (%) de los alelos exóticos diagnóstico y coeficiente de hibridación q (%) en los ríos estudiados.

Al analizar separadamente las cuencas del Guadalquivir, el 39% de las localidades no presentaron alelos de loci microsatélites indicativos de repoblación con ejemplares foráneos, elevándose este porcentaje al 44 y 57%, empleando el coeficiente de q y el locus $LDH-CI^*$, respectivamente.

En relación a los resultados obtenidos en la cuenca del Alto Guadalquivir, los análisis de loci microsatélites revelaron la existencia de siete alelos exóticos en las 31 variantes alélicas encontradas. La introgresión estimada a partir de la frecuencia de estos alelos osciló dependiendo de la localidad estudiada (Tabla III.7), alcanzando un valor medio de 4% frente al 8% para el alelo $LDH-CI^*90$. Los niveles de introgresión estimados a partir del coeficiente q fueron moderados, presentando el 94% de las muestras analizadas valores próximos a uno (Figura III.8), lo que indica una baja incidencia del material genético alóctono en esta cuenca.

Dentro de la cuenca del Guadiana Menor fueron detectados siete alelos exóticos en las 49 variantes alélicas encontradas. La introgresión media estimada a partir de la frecuencia de estos alelos (14%) fue ligeramente inferior a la obtenida empleando el marcador $LDH-CI^*90$ (20%). Los niveles de introgresión estimados a partir del coeficiente q fueron elevados, presentando únicamente el 69% de las muestras analizadas valores próximos a uno (Figura III.8), por lo que la incidencia de las truchas alóctonas en la cuenca es elevada.

En la cuenca del Genil, los análisis de loci microsatélites revelaron la existencia de nueve alelos exóticos en las 50 variantes alélicas encontradas. La introgresión estimada a partir de la frecuencia de estos alelos osciló dependiendo de la localidad estudiada, alcanzando un valor medio de 1%, similar al obtenido en el análisis del marcador diagnóstico $LDH-CI^*90$. Los niveles de introgresión estimados a partir del coeficiente q fueron moderados, presentando el 89% de las muestras analizadas valores próximos a uno (Figura III.8), lo que indica una baja incidencia del material genético alóctono en la cuenca.

Por otro lado, las localidades pertenecientes a la vertiente mediterránea presentaron introgresión en prácticamente todas las localidades estudiadas (87%), aumentando el valor medio obtenido con el coeficiente de hibridación (93%) y con el locus $LDH-CI^*$ (100%).

En las localidades pertenecientes a la cuenca del Guadalfeo fueron detectados 15 alelos exóticos de las 54 variantes alélicas encontradas. La introgresión media estimada a partir de la frecuencia de estos alelos (16%) fue inferior a la obtenida empleando el marcador $LDH-CI^*90$ (29%). Los niveles de introgresión estimados a partir del coeficiente q fueron elevados, presentando el 48% de las muestras valores próximos a uno. Dentro de esta cuenca, un 2% de los ejemplares se asignaron como alóctonos (rango de $q = 0-0,100$), mientras que el 50% mostró unos niveles de mezcla con trucha exótica moderados o elevados (Figura III.9), lo que indica una incidencia severa del material genético foráneo.

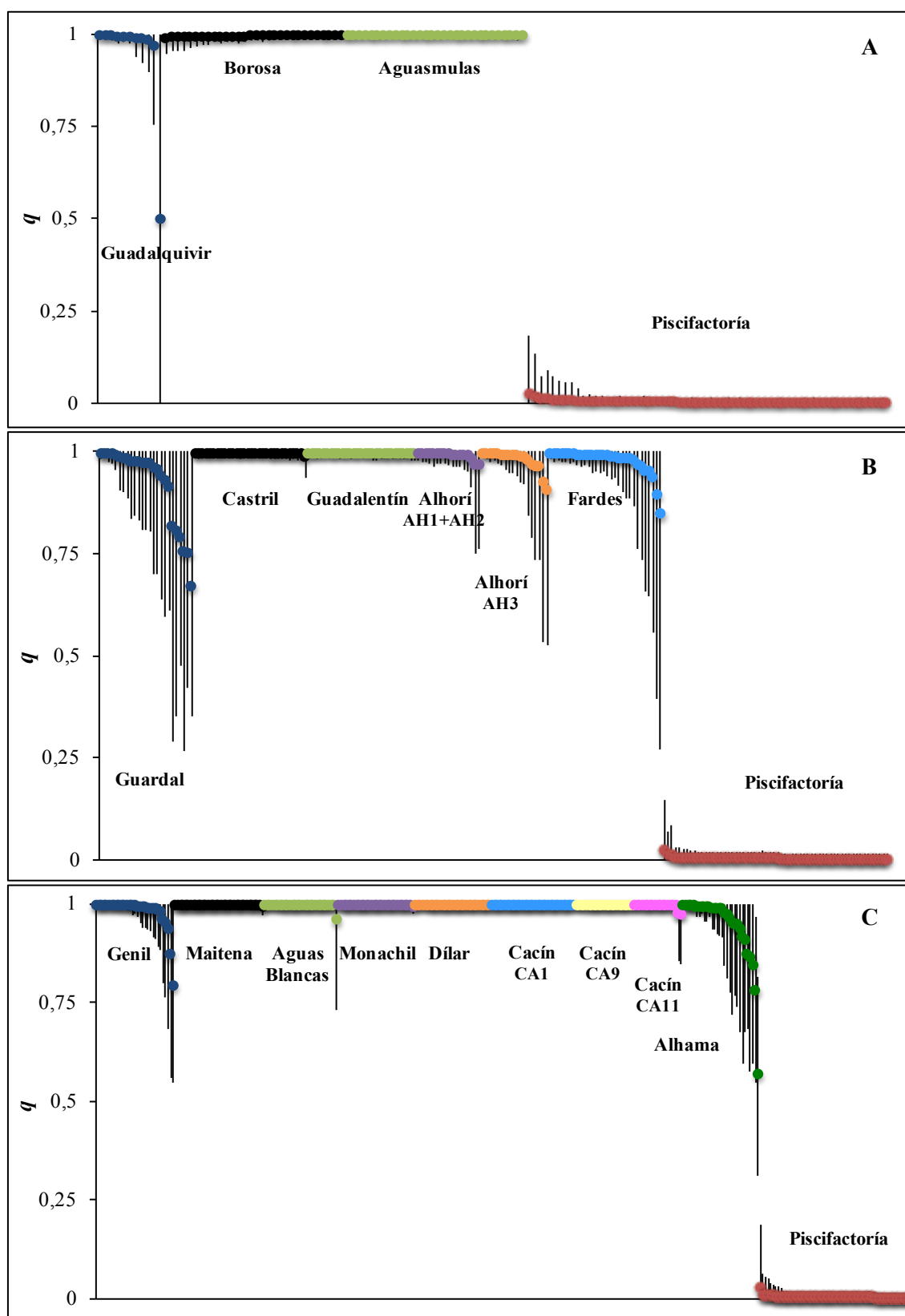


Figura III.8. Valor medio del coeficiente de hibridación (q) y su intervalo de confianza al 90% obtenido con el programa *STRUCTURE* en las localidades analizadas de la cuencas del Alto Guadalquivir (A), Guadiana Menor (B) y Genil (C); junto con los ejemplares de referencia alóctona (Piscifactoría).

La cuenca del Adra presentó una alta introgresión por material genético alóctono, presentando 16 alelos exóticos en las 42 variantes alélicas encontradas. La introgresión estimada a partir de la frecuencia de estos alelos osciló dependiendo de la localidad estudiada, alcanzando un valor medio de 34% frente al 62% en el análisis del marcador diagnóstico *LDH-C1*90*. Los niveles de introgresión estimados a partir del coeficiente q fueron igualmente elevados, presentando el 40% de las muestras analizadas valores próximos a uno (Figura III.9).

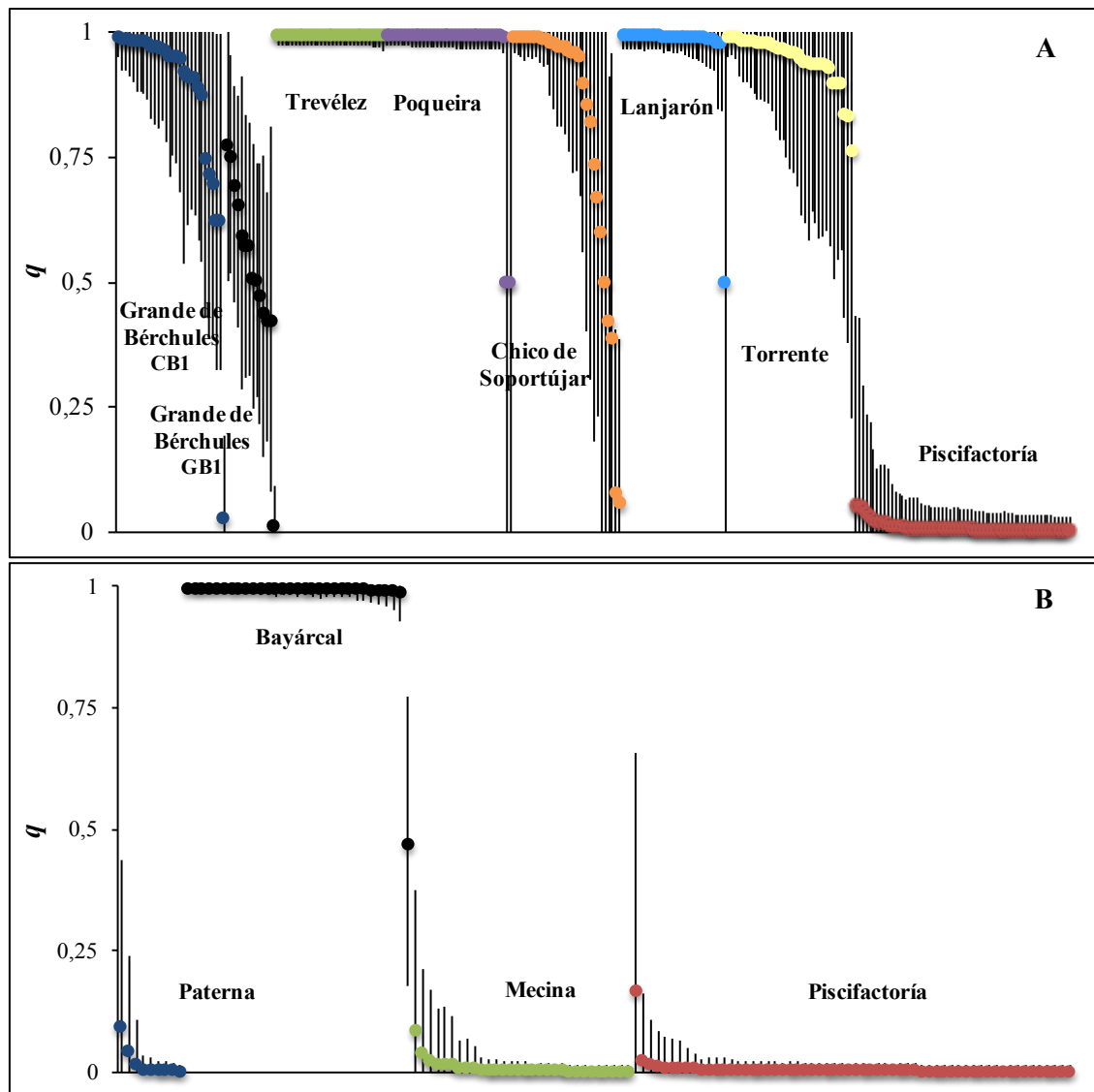


Figura III.9. Valor medio del coeficiente de hibridación (q) y su intervalo de confianza al 90% obtenido con el programa *STRUCTURE* en las localidades analizadas de las cuencas del Guadalfeo (A) y Adra (B); junto con los ejemplares de referencia alóctona (Piscifactoría).

Los análisis de loci microsatélites mostraron diez alelos exóticos en las 33 variantes alélicas encontradas en la cuenca del Andarax. La introgresión estimada a partir de la frecuencia de estos alelos alcanzó un valor medio del 4%, similar al 5% obtenido en el análisis del

marcador diagnóstico *LDH-CI*90*. Los niveles de introgresión estimados a partir del coeficiente de mezcla fueron moderados, alcanzando un valor medio de 0,911 (Figura III.10).

Finalmente, dentro de la cuenca del Segura se detectaron 13 alelos exóticos de las 47 variantes alélicas encontradas. La introgresión media estimada a partir de la frecuencia de estos alelos (9%) fue ligeramente inferior a la obtenida empleando el marcador *LDH-CI*90* (16%). Los niveles de introgresión estimados a partir del coeficiente q fueron elevados, presentando el 66% de las muestras analizadas valores próximos a uno (Figura III.10), por lo que la incidencia del truchas alóctonas en la cuenca es elevada.

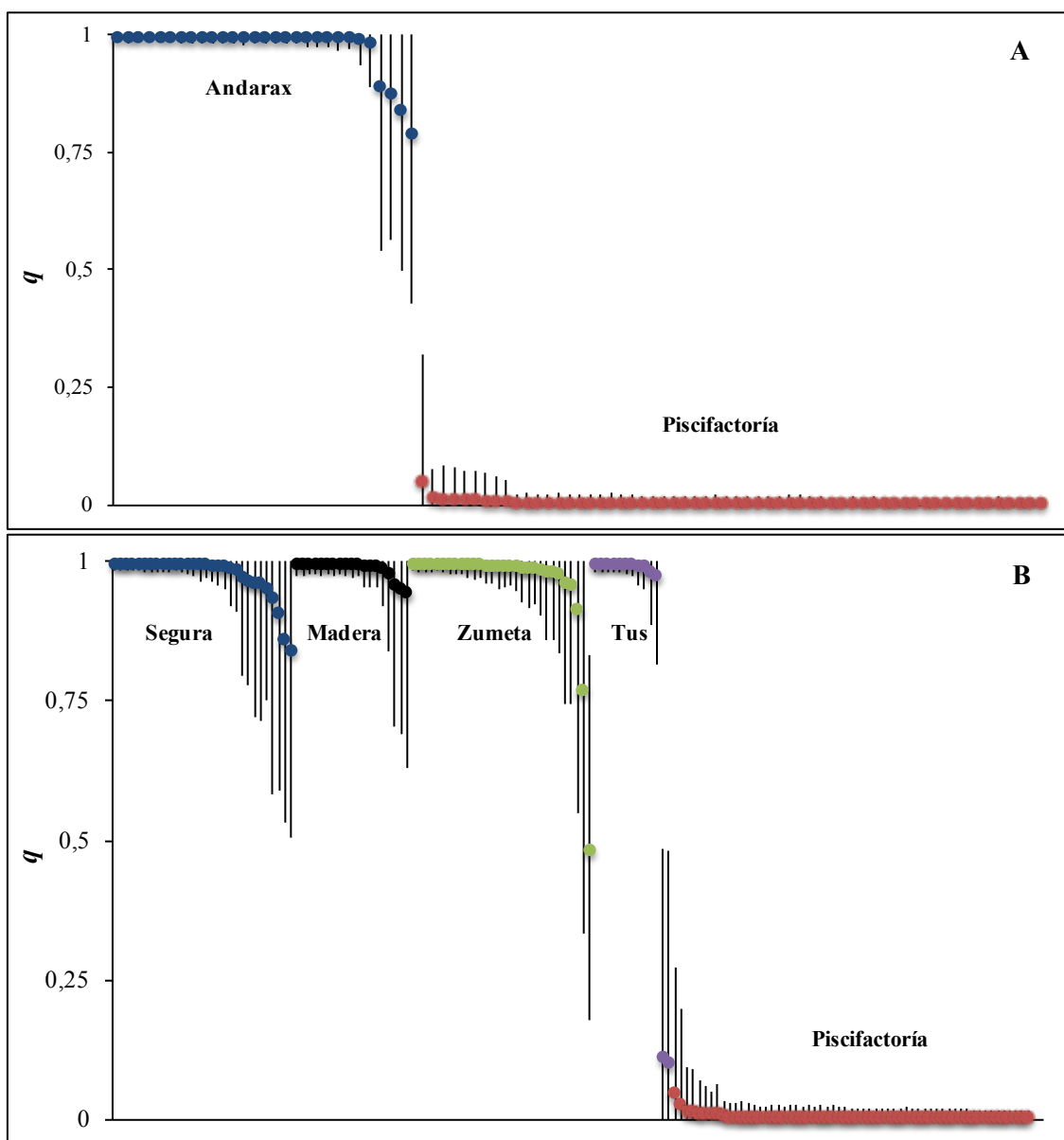


Figura III.10. Valor medio del coeficiente de hibridación (q) y su intervalo de confianza al 90% obtenido con el programa *STRUCTURE* en las localidades analizadas de la cuencas del Andarax (A) y Segura (B); junto con los ejemplares de referencia alóctona (Piscifactoría).

III.4. DISCUSIÓN

III.4.1. Introgresión genética en el conjunto de las poblaciones

El uso combinado de marcadores moleculares en la Trucha Común es de gran utilidad en los estudios de gestión poblacional y evaluación de las repoblaciones, ya que permiten asignar individuos a poblaciones de la misma cuenca o río, e incluso identificar sus progenitores en un stock de repoblación de origen nativo. A pesar del enorme esfuerzo de repoblación ejercido durante las décadas pasadas en el sur de la Península Ibérica, la presencia de los marcadores foráneos fue muy variable. Los altos valores de introgresión encontrados en gran parte de las localidades indicaron la existencia de una elevada viabilidad de las truchas repobladas y sus descendientes. Por otra parte, la inexistencia de diferencias significativas con el equilibrio de Hardy-Weinberg en casi la totalidad de las localidades que presentaron introgresión sugiere que los genes de las truchas de origen alóctono se incorporan a las poblaciones nativas mediante cruzamientos aleatorios con las truchas autóctonas.

En la presente Tesis se estudió en primer lugar la presencia de ejemplares con origen alóctono o híbrido, que fueron encontrados en un número elevado de localidades (70%) y ríos (85%). Por una parte, en las cuencas del Guadalquivir la mitad de las localidades y un 75% de los ríos presentaron ejemplares con el alelo diagnóstico *LDH-CI*90*, tratándose de un valor bastante más elevado que el observado en estudios anteriores, donde no fue detectada introgresión genética (García-Marín 1992, García-Marín y Pla 1996, Almodóvar *et al.* 2006, Sanz *et al.* 2006). Por otra parte, en las cuencas de la vertiente mediterránea todas las localidades mostraron introgresión nuclear, con la excepción del río Segura aguas abajo del embalse de Anchuricas (SE4) y la localidad más aguas arriba muestreada en el río Tus (TU1). Sin embargo, cabe destacar que el número de ejemplares analizado en estas localidades fue muy bajo (N= 4 y N= 1, respectivamente), por lo que no se puede descartar del todo la presencia de ejemplares con genes alóctonos. La frecuencia de localidades con introgresión fue muy similar o superior a la encontrada con anterioridad por otros autores en cuencas mediterráneas (media= 82%, rango= 67-100%; García-Marín y Pla 1996, Sanz *et al.* 2002, 2006, Almodóvar *et al.* 2006).

Por otro lado, se estudió el nivel de introgresión medio mediante el análisis del locus diagnóstico nuclear *LDH-CI** de la enzima L-lactato deshidrogenasa. En primer lugar, en las cuencas del Guadalquivir la presencia del alelo indicador de ejemplares de repoblación *LDH-CI*90* (9%) fue ligeramente inferior al valor obtenido por otros autores en la cuenca del Tajo, también atlántica (media 13%, rango 0-79%; García-Marín y Pla 1996, Machordom *et al.* 1999, Almodóvar *et al.* 2002, 2006), y algo superior a los promedios observados tanto en la cuenca del Duero (media 4%, rango 0-29%; García-Marín y Pla 1996, Machordom *et al.* 1999, Sanz *et al.* 2000, Almodóvar *et al.* 2001, 2006) como en ríos de las cuencas noribéricas (media 5%, rango 0-100%, García-Marín *et al.* 1991, García-Marín 1992, Morán *et al.* 1991, 1995, Martínez *et al.* 1993, Arias *et al.* 1995, Arias 1996, García-Marín y Pla 1996, Blanco *et al.* 1998, Bouza *et al.* 1999, Sanz *et al.* 2000, Almodóvar *et al.* 2001, 2006, Cagigas *et al.* 2002). En segundo lugar, en las cuencas de la vertiente mediterránea, el nivel de introgresión fue muy superior (34%), siendo

mayor que el encontrado en las mismas cuencas por otros autores (media 25%, rango 0-66%; García-Marín 1992, García-Marín y Pla 1996, Sanz *et al.* 2002, Almodóvar *et al.* 2006), así como en otros ríos mediterráneos de la Península Ibérica (media 20%, rango 0-100%; García-Marín 1992, García-Marín y Pla 1996, García-Marín *et al.* 1998,1999, Blanco *et al.* 1998, Cagigas *et al.* 1999, 2002, Sanz *et al.* 2002, Almodóvar *et al.* 2006). En particular, excluyendo la cuenca del Segura, la introgresión genética media observada en los ríos de la vertiente mediterránea (38%) es muy superior a la encontrada en ríos de esta área por otros autores (media 21%, rango 5-40%; García-Marín 1992, García-Marín y Pla 1996, Sanz *et al.* 2002), aunque el número de localidades estudiadas con anterioridad es mucho menor que el abordado en el presente estudio. Por último, el valor medio encontrado en la cuenca del Segura (22%) es similar al obtenido por otros autores en ríos de esta cuenca (media 27%, rango 0-66%; García-Marín 1992, García-Marín y Pla 1996, Sanz *et al.* 2000, Almodóvar *et al.* 2006).

Al estudiar el estado de conservación de los ríos se observó que, dentro de la cuenca del Guadalquivir, el estado de las localidades de las cuencas del Genil y Guadiana Menor fue mejor que el encontrado en el Alto Guadalquivir, donde se alcanzaron grados de introgresión altos o severos en la mitad de las localidades. Con respecto a los cursos analizados en la vertiente mediterránea, no presentaron en su conjunto un buen estado de conservación genética, ya que los niveles de introgresión fueron muy elevados en gran parte de las localidades. De manera general, en las localidades suribéricas se detectó un nivel medio de introgresión alto (20%), así como una elevada variabilidad en la presencia del alelo exógeno *LDH-CI*90*. Asimismo, el valor medio de la frecuencia del alelo diagnóstico fue superior a los promedios obtenidos en otras cuencas de la Península Ibérica, como las cuencas cantábricas (5%), la cuenca del Duero (4%), la cuenca del Tago (13%) o la cuenca del Ebro (16%) (Almodóvar *et al.* 2001, 2002, 2006).

La variabilidad observada en los valores de introgresión medios en el sur de la Península Ibérica muestra que el efecto negativo de las repoblaciones es muy variado y que depende de diversos factores genéticos y no genéticos específicos a nivel de localidad, así como de las prácticas de repoblación utilizadas (Almodóvar *et al.* 2006). Fleming y Petersson (2001) describieron un patrón similar en una comparación a gran escala de poblaciones europeas. Estos autores observaron que en el 45% de los estudios analizados no hubo introgresión o la frecuencia de introgresión fue baja en ríos donde se había repoblado intensamente durante muchas décadas. Sin embargo, en gran parte de las poblaciones analizadas se encontró un cruzamiento alto entre las truchas de repoblación procedentes de piscifactoría y las truchas nativas. Por otra parte, Almodóvar *et al.* (2006) realizaron una revisión de todos los estudios genéticos en poblaciones de Trucha Común de la Península Ibérica, encontrando una elevada variabilidad en el nivel de introgresión entre las distintas cuencas. El estudio detectó que el efecto negativo de las repoblaciones depende de las características ecológicas del río de acogida, principalmente del régimen de caudales y la productividad del agua, así como de las prácticas de repoblación utilizadas. De hecho, en un estudio realizado a partir de los datos de obtenidos en esta Tesis, Almodóvar *et al.* (2007) detectaron que el nivel de introgresión observado para el alelo *LDH-CI*90* en distintas cuencas y vertientes, así como su evolución a lo largo del tiempo, no está determinado por el número de ejemplares alóctonos introducidos. Por tanto, a pesar de

que los programas de repoblación han sido muy similares a lo largo del tiempo en los ríos estudiados, los niveles de introgresión genética son muy variados e incluyen un rango de valores muy amplio. Estos resultados también se ven apoyados por los obtenidos en otras especies de salmónidos (*Salmo salar*, García de Leániz *et al.* 1989, Crozier 1993; *Oncorhynchus keta*, Altukhov y Salmenkova 1990).

Las condiciones ambientales locales pueden ser en parte responsables de la diferente eficacia mostrada por las truchas repobladas en el medio natural (Fleming *et al.* 1997, Sundström y Johnsson 2001, Hansen 2002). Además, la creciente alteración del hábitat fluvial por actividades humanas también parece incrementar los efectos negativos de las repoblaciones (Largiader y School 1995). Almodóvar *et al.* (2007) analizaron la relación entre la frecuencia del alelo diagnóstico *LDH-CI*90* y diferentes variables ambientales y poblacionales que pudieran influir en la viabilidad en el medio natural de las truchas de repoblación o de sus híbridos con truchas autóctonas. Sin embargo, en el caso concreto de las cuencas suribéricas, las diferencias en introgresión se debieron a otras variables no analizadas. En concreto, la irregularidad del caudal podría tener un efecto en el nivel de introgresión de las poblaciones, tal como encontraron Almodóvar *et al.* (2006), de manera que en ríos donde el caudal es muy fluctuante la supervivencia de las truchas de repoblación o sus descendientes parece menor. Asimismo, la disponibilidad de hábitat adecuado para las distintas clases de edad puede jugar un papel muy relevante en la viabilidad de las truchas repobladas (Almodóvar *et al.* 2006). Por otro lado, la situación demográfica de las poblaciones autóctonas previa a la introducción de truchas de origen alóctono puede haber influido en el éxito de las repoblaciones. En este sentido, dado que la zona estudiada se encuentra próxima al límite meridional de la distribución geográfica de la Trucha Común, las condiciones ambientales son muy restrictivas para los requerimientos de la especie, por lo que los ríos tendrían probablemente un número de efectivos bajo antes de comenzar la introducción de ejemplares de origen alóctono. Todos estos factores, unido a la disponibilidad de hábitat en los ríos, podría haber influido en la competencia entre las truchas nativas y repobladas, determinando la supervivencia de estas últimas en el medio natural.

La pérdida del hábitat y la fragmentación poblacional están consideradas como una de las principales amenazas que afectan a la diversidad biológica. La presencia de barreras artificiales o naturales en los ríos provoca una reducción del tamaño poblacional y limita el intercambio de material genético con las poblaciones próximas, provocando la disminución de la diversidad genética a corto o largo plazo y cambios en la estructura poblacional (Carlsson *et al.* 1999, Meldgaard *et al.* 2003, Van Houdt *et al.* 2005, Heggenes y Røed 2006, Horreo *et al.* 2011). Sin embargo, la alta estructuración genética encontrada para la Trucha Común (Bouza *et al.* 1999, Aurelle y Berrebi 2001, Sanz *et al.* 2002, Corujo *et al.* 2004, Ruzzante *et al.* 2004, Sønstebo *et al.* 2007, McKeown *et al.* 2010), junto con su elevada capacidad de adaptación local (Taylor 1991, Hansen *et al.* 2002, Hansen *et al.* 2007, Meier *et al.* 2011) hace posible que las localidades analizadas presenten poblaciones estables y auto-sostenibles de truchas nativas adaptadas localmente. Por lo tanto, en el presente escenario en el que la introgresión está repartida de manera heterogénea por las cuencas estudiadas, la existencia de barreras infranqueables protegería a las poblaciones de ser colonizadas por ejemplares foráneos de localidades próximas (Rahel 2013), evitando la pérdida de variación genética nativa por

cruzamiento con ejemplares foráneos (Van Houdt *et al.* 2005, Caudron *et al.* 2011). Sin embargo, en la presente Tesis no se detectaron ni diferencias en el nivel de introgresión al comparar ríos y localidades, ni estructuración genética a nivel de localidad (Capítulo IV) ya que, salvo contadas excepciones, únicamente se observaron diferencias genéticas entre cursos fluviales y cuencas (Capítulo IV). Por lo tanto, restaurar la conectividad a lo largo de los ríos eliminando las barreras infranqueables o construyendo pasos para peces debería ser una estrategia prioritaria para la recuperación de las poblaciones de Trucha Común en el sur de la Península Ibérica.

El efecto de la introducción de genes alóctonos ha afectado en gran medida a la estructura genética de la Trucha Común en las localidades analizadas. Las truchas no pueden adaptarse a un determinado entorno si hay una adición continua de peces no adaptados. Por ello, la opción de repoblación con truchas autóctonas ayudaría a incrementar las densidades poblacionales, así como a disminuir los niveles de introgresión genética sin que suponga un riesgo el cruzamiento con ejemplares nativos (Ryman y Laikre 1991, Ferguson 2007, Caudron *et al.* 2011). Sin embargo, no se debe subestimar el riesgo de endogamia potencial y la pérdida de variación genética generadas por la introducción de grandes cantidades de ejemplares de piscifactoría (Ryman y Laikre 1991, Hansen *et al.* 2000), debiendo ser estudiado y evaluado cada caso particular. Por último, es importante destacar que la estabilidad poblacional a largo plazo a menudo no es posible sin aplicar estrategias de mejora del hábitat (restauración de orillas, eliminación de saltos infranqueables, mejora del régimen hidrológico, entre otras.), que en general son más eficaces que la introducción de ejemplares (Cowx 1994, Fjellheim *et al.* 2003, Oosterhout *et al.* 2005, Ferguson 2007).

III.4.2. Evolución temporal de la introgresión genética

La selección natural parece actuar en contra de las truchas repobladas o sus descendientes, incluyendo los híbridos, limitando así la introgresión en las poblaciones nativas (Hansen *et al.* 1995, Largiader y Scholl 1996, Skaala *et al.* 1996, Poteaux *et al.* 1998, Fritzner *et al.* 2001, Hansen 2002, Hansen *et al.* 2010). El grado de introgresión dependerá, por tanto, de la fuerza de dos factores opuestos como la migración y la selección, es decir del equilibrio migración-selección, tal como sugieren Hansen *et al.* (1995) y Hansen (2000). Si la tasa de inmigración de las truchas de repoblación es mayor que la tasa a la que son eliminadas de la población por selección, la introgresión persistirá a lo largo del tiempo y finalmente las truchas repobladas o sus híbridos reemplazarán a las truchas nativas (Hansen *et al.* 1995). La persistencia en el tiempo de la introgresión puede potencialmente erosionar la estructura genética de las poblaciones nativas. García-Marín *et al.* (1999) estimaron en un arroyo de los Pirineos orientales que, a pesar del bajo éxito reproductor de las truchas repobladas, aproximadamente un 5% de la ascendencia nativa de los individuos se perdía cada año como consecuencia de las repoblaciones. Estos resultados son similares a la estima del 5,5% por año obtenida por Arias *et al.* (1995) en un río del norte de España y 5,6% encontrado por Blanco *et al.* (1998) en un río de la cuenca del Ebro. Por otra parte, el hecho de que la introgresión media en las poblaciones analizadas en la actualidad sea similar o mayor en la mayor parte de los casos

al obtenido hace cuatro o diez años, indica que los ejemplares de repoblación o sus descendientes se reproducen con las poblaciones autóctonas y son capaces de persistir en el tiempo en estos ríos aunque cesen o disminuyan las repoblaciones. La tendencia observada también puede deberse al bajo tamaño poblacional analizado o a las características ambientales de los ríos, de manera que unas condiciones ecológicas favorables para las truchas procedentes de piscifactoría puedan haber permitido una mejor adaptación de estos individuos.

La persistencia en el tiempo de la introgresión ha sido estudiada previamente en otras áreas. Así, en un estudio realizado en Francia en un río de la vertiente mediterránea, el grado de introgresión de la población se mantuvo estable después de seis años del cese de las repoblaciones (Poteaux *et al.* 1998). Dentro de la Península Ibérica, Araguas *et al.* 2008 observaron un patrón similar en poblaciones mediterráneas, detectándose una fuerte persistencia de genotipos alóctonos en un periodo de 13 años en poblaciones designadas como refugios genéticos. Asimismo, Almodóvar *et al.* (2001) observaron en poblaciones de la cuenca del Duero analizadas con anterioridad que la interrupción de las repoblaciones parecía haber sido una buena medida de gestión para restaurar las poblaciones nativas, ya que los alelos diagnóstico de repoblación no se encontraron en aquellas poblaciones donde las repoblaciones pararon hacía una década. Sin embargo, en las poblaciones en las que la repoblación había cesado tres años atrás, el efecto de la introgresión genética por genes foráneos todavía persistía en los individuos analizados.

Como se ha comentado anteriormente, la potencial selección en contra de los genes foráneos conduciría a una recuperación natural de las poblaciones tras un cierto número de generaciones, como se ha observado en la cuenca del Tajo y Duero (Almodóvar *et al.* datos no publicados). Sin embargo, la comparación de la evolución de las tasas de introgresión en el tiempo sugiere que existe poca o nula selección en contra de las truchas repobladas y sus descendientes en casi todas las poblaciones. Además, aunque las repoblaciones con Trucha Común foránea cesaron a finales de los noventa, los ríos han sido repoblados con millones de truchas en los últimos cien años, por lo que esta inmigración masiva en las poblaciones podría ser lo suficientemente poderosa como para exceder la tasa a la que los individuos repoblados y sus descendientes se eliminan por selección (Hansen *et al.* 1995). Como consecuencia de los distintos factores, parece que el tiempo que tardan en desaparecer los genes foráneos de las poblaciones nativas es mucho mayor que el esperado en algunos casos y que su capacidad de recuperación depende de factores abióticos y bióticos. Quizás sea necesario más tiempo para que el efecto de las repoblaciones en las poblaciones nativas se pierda, tal como sugieren Poteaux *et al.* (1998) y Almodóvar *et al.* (2001, 2006).

III.4.3. Comparación de marcadores genéticos aplicados al estudio de la introgresión nuclear

El uso combinado de varios marcadores moleculares en el estudio de la introgresión genética ha permitido identificar inequívocamente los individuos procedentes de repoblación de los nativos en las localidades analizadas. Los resultados obtenidos en el estudio de los loci microsatélites mostraron unos valores de introgresión inferiores a los encontrados empleando el alelo diagnóstico *LDH-CI*90*. Sin embargo, el número de localidades que mostraron introgresión genética (73%) fue superior al obtenido a partir del locus *LDH-CI** (66%). En las poblaciones donde ha existido un gran esfuerzo de repoblación, los análisis basados en un único locus presentan algunas desventajas, ya que un resultado negativo no implica que la muestra analizada sea totalmente autóctona y viceversa. Por otro lado, los loci microsatélites permiten detectar ejemplares híbridos que por su bajo grado de introgresión no serían identificados con otro tipo de análisis, lo que explica que el porcentaje de localidades con introgresión haya sido mayor con este método.

El empleo de modelos basados en la estadística bayesiana ha permitido identificar en la Trucha Común la presencia o ausencia de introgresión potencial así como detectar ejemplares híbridos o exóticos en un gran número de cursos hidrográficos (Hansen 2002, Hansen *et al.* 2009, Vera *et al.* 2010b, Vilas *et al.* 2010, Meraner *et al.* 2010, Sanz *et al.* 2011, Caudron *et al.* 2012). Al comparar la introgresión detectada empleando aloenzimas y loci microsatélites en otros ríos europeos, se ha observado una mayor eficiencia a partir de microsatélites cuando la población autóctona y la introducida se encuentran débilmente diferenciadas (Aurelle *et al.* 2002, Corujo *et al.* 2004), mientras que los microsatélites son menos efectivos cuando la divergencia es elevada dado que muestran una menor frecuencia de alelos exóticos (Poteaux *et al.* 2001). Por otro lado, en un estudio comparativo empleando datos de microsatélites y aloenzimas con varios métodos analíticos, Sanz *et al.* (2009) no observaron diferencias entre los marcadores genéticos utilizados en poblaciones mediterráneas de la Península Ibérica. Los resultados de esta Tesis mostraron que tanto el empleo del locus *LDH-CI** como el uso de loci microsatélites son igual de útiles para analizar la incidencia de la repoblación en poblaciones suribéricas. Sin embargo, excluyendo aquellas localidades donde no fue detectada introgresión genética, los niveles de introgresión obtenidos empleando el coeficiente *q* fueron inferiores a los observados a partir de las frecuencias de los alelos diagnósticos de origen foráneo. Además, la frecuencia de alelos exóticos de loci microsatélites fue menor a la estimada a partir del locus *LDH-CI**. No obstante, cuatro localidades mostraron unas frecuencias de alelos autóctonos ligeramente superiores al obtenido a partir de la variante *LDH-CI*90*. Además, otras cuatro localidades presentaron un acervo génico nativo para el locus *LDH-CI**, siendo detectada la presencia de alelos exóticos o genotipos híbridos a nivel nuclear empleando los loci microsatélites.

El polimorfismo observado a nivel proteico es debido a las distintas presiones selectivas a las que están sometidos los individuos, y conlleva cambios en la regulación enzimática o en la especificidad por el sustrato de la enzima (Skibinski y Ward, 1998). En el caso concreto del locus *LDH-CI** en la Trucha Común, la selección natural parece actuar sobre las truchas con

genotipo foráneo o híbrido, limitando así la introgresión en las poblaciones nativas (Henry y Ferguson 1985, Hansen *et al.* 1995, Largiadèr y Scholl 1996, Skaala *et al.* 1996, Poteaux *et al.* 1998, Almodóvar *et al.* datos no publicados). Asimismo, la deriva genética afectaría en mayor medida a aquellos loci no selectivamente neutros. Es decir, en aquellos genes o loci que presenten sólo dos variantes alélicas, el alelo foráneo presentará una baja frecuencia en la población autóctona, por lo que si existe una presión selectiva negativa será eliminado al finalizar las reintroducciones (Poteaux *et al.* 2001). La ausencia de la variante *LDH-CI*90* en algunas de las localidades estudiadas parece ser generada por una selección positiva de las truchas con genotipo nativo sobre los homocigotos y heterocigotos con el alelo exótico *LDH-CI*90*. Suponiendo que esta presión selectiva no es ejercida sobre los loci microsatélites, las variantes alélicas de origen foráneo podrían por deriva genética aumentar su frecuencia y fijarse a nivel poblacional, explicando las mayores frecuencias alélicas exóticas o la presencia de genotipos híbridos. Por otro lado, esta selección en contra del alelo *LDH-CI*90* no parece ser observada en los ríos Alhorí, Genil, Lanjarón y Madera. De hecho, la evolución temporal sugiere una poca o nula selección negativa sobre esta variante alélica, ya que incluso en el caso del río Genil su frecuencia aumentó casi un 10% en una década. La mayor frecuencia de alelos de microsatélites foráneos parecer ser generada por una mayor acción de la deriva genética en estas poblaciones. Los resultados obtenidos en el estudio de la diversidad genética en estos ríos mostraron signos de cuello de botella reciente (Capítulo IV). La presencia de un cuello de botella produciría una aceleración de la acción de la deriva genética en estas localidades y ríos, explicando las diferencias observadas entre los marcadores empleados en cuanto a la detección del nivel de introgresión.

La utilización del locus *LDH-CI** en el estudio de la introgresión genética mostró una mayor eficiencia y una alta persistencia a corto plazo, tanto en los ríos suribéricos analizados en la presente Tesis como en otros ríos mediterráneos (Poteaux *et al.* 1998, García-Marín *et al.* 1999, Almodóvar *et al.* 2006, Sanz *et al.* 2006, Araguas *et al.* 2008) y suratlánticos (Almodóvar *et al.* 2001, 2006, Aurelle *et al.* 2002, Izquierdo *et al.* 2006). Este hecho, sumado a su menor coste de detección, mayor rapidez de análisis y fácil comparación con otras poblaciones, hacen de este marcador el principal estimador de los efectos de las repoblaciones e identificador de ejemplares híbridos y foráneos en las poblaciones mediterráneas (Berrebi *et al.* 2000, Aparicio *et al.* 2005, Schöffmann *et al.* 2007, Kohout *et al.* 2012, Lerceteau-Köhler *et al.* 2013). Sin embargo, si los resultados obtenidos empleando el marcador *LDH-CI** no coincidieran con los registros de reintroducciones o los datos no fueran fiables, la amplificación de loci microsatélites podría realizarse a partir de las mismas muestras de ADN (Sanz *et al.* 2006).

**IV. DIVERSIDAD Y ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA DE LA
TRUCHA COMÚN *SALMO TRUTTA* EN EL SUR DE LA
PENÍNSULA IBÉRICA**

IV.1. INTRODUCCIÓN

La amplia distribución geográfica de algunas especies a menudo es consecuencia de su elevada variabilidad tanto fenotípica como etológica y genética (Schluter 2000). Las diferencias poblacionales que se observan son el resultado de adaptaciones locales y/o de la deriva genética, generadas por una disminución o interrupción del flujo génico (Adkinson 1995, Via 2002). Esta variabilidad intraespecífica puede aumentar el potencial de adaptación de una especie, permitiéndole ocupar un amplio rango de condiciones ecológicas o adaptarse a las variaciones ambientales (Lavergne *et al.* 2010). La preservación de esta variabilidad es primordial para garantizar tanto el mantenimiento a largo plazo de las especies (Hilborn *et al.* 2003, Lindley *et al.* 2009, Schindler *et al.* 2010) como la resiliencia de los ecosistemas (Luck *et al.* 2003, Frankham 2005, Reusch *et al.* 2005).

La Trucha Común es una de las especies más ampliamente distribuida en las aguas continentales europeas, siendo la temperatura y calidad del agua junto con la disponibilidad del sustrato para la freza los principales limitantes de su distribución geográfica (Almodóvar 2001, Armstrong *et al.* 2003, Klemetsen *et al.* 2003, Jonsson y Jonsson 2011). Esta especie presenta una alta diversidad morfológica, fisiológica y ecológica (Jonsson y Jonsson 2011), asociada fundamentalmente a la elevada plasticidad que le permite adoptar diferentes patrones de crecimiento y reproductivos (Almodóvar 1999, Nicola y Almodóvar 2002, 2004). Esto ha favorecido además que haya sido introducida ampliamente fuera de su área de distribución nativa (Elliot 1994, Jonsson y Jonsson 2011).

Desde el punto de vista genético, la Trucha Común es una de las especies más polimórficas dentro de la familia de los Salmónidos, presentando una elevada diferenciación a nivel poblacional tanto a escala local como europea (Ferguson 1989). Esto ha conllevado un continuo debate sobre su estatus sistemático, sin que exista actualmente un consenso acerca de si deben considerarse especies, subespecies o poblaciones diferenciadas. Además, la distribución de la variabilidad genética es compleja. En ocasiones ha sido observada una importante diferenciación genética entre ríos, aunque no dentro de ellos (Morán *et al.* 1995, Hansen y Mensberg 1998, Aurelle y Berrebi 2001, Hansen *et al.* 2002). Otros estudios sugieren sin embargo procesos de aislamiento por distancia dentro de una misma cuenca fluvial (Estoup *et al.* 1998, Carlsson y Nilsson 2000, Heggenes y Røed 2006, Griffiths *et al.* 2009a, Stelkens *et al.* 2012), mientras que en otros casos se ha detectado un importante aislamiento entre poblaciones próximas, incluso simpátridas (Allendorf *et al.* 1976, Ferguson y Mason 1981, Ferguson y Taggart 1991, Palmé *et al.* 2013). En las cuencas mediterráneas se observa una elevada diferenciación dentro del mismo curso fluvial (Sanz *et al.* 2002, Snoj *et al.* 2009, Keller *et al.* 2011, Lerceteau-Köhler *et al.* 2013). De hecho, los resultados obtenidos hasta la fecha dentro de la Península Ibérica ponen de manifiesto la enorme singularidad de algunas poblaciones estudiadas (Sanz *et al.* 2002, 2011, Vera *et al.* 2010a). Por tanto, parece esencial para la conservación de esta especie que la gestión esté centrada en poblaciones locales.

Debido a su papel como refugio glacial, la Península Ibérica está considerada como un *hotspot* de diversidad de especies, encontrándose en la Trucha Común una fuerte diferenciación

genética a nivel poblacional (Machordom *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001, Presa *et al.* 2002, Sanz *et al.* 2002, 2011, Cortey *et al.* 2004, 2009, Vera *et al.* 2013). Además, las poblaciones que habitan los ríos ibéricos se sitúan en el límite meridional de la distribución geográfica de la especie, y sus variedades pueden constituir en muchas ocasiones adaptaciones locales particulares dentro del umbral de tolerancia de la especie. Las poblaciones periféricas generalmente presentan densidades poblacionales bajas, siendo por ello más propensas a la extinción local y más vulnerables a los impactos antropogénicos y a los efectos del cambio climático (Hampe y Petit 2005, Nicola *et al.* 2008, 2009, Almodóvar *et al.* 2012).

El conocimiento de los niveles y la distribución de la diversidad genética y ecológica es un elemento esencial a tener en cuenta por los programas de gestión y conservación. De hecho, el estudio de la diversidad genética es primordial para reconstruir patrones filogeográficos, inferir procesos demográficos o definir los niveles de flujo genético intraespecíficos existentes (Avice 2004). Además, los análisis a nivel intrapoblacional permiten conocer el estado de “salud genética” que presentan las poblaciones, ya que se ha comprobado que niveles bajos de variabilidad genética suelen estar relacionados con un mayor riesgo de extinción (Frankel *et al.* 1995, Frankham *et al.* 2002, Reed y Frankham 2003), permitiendo desarrollar directrices enfocadas a la preservación de la variabilidad genética y al mantenimiento a largo plazo de las especies en peligro de extinción (Fraser y Bernatchez 2001, Allendorf y Ryman 2002).

Las poblaciones autóctonas de Trucha Común han disminuido en España en más de un 20% (Doadrio 2001), pudiendo llegar prácticamente a desaparecer de las cuencas mediterráneas antes del año 2100 como consecuencia del cambio climático (Almodóvar *et al.* 2012). En el sur de la Península Ibérica esta regresión es más acusada, ya que se ha reducido considerablemente su área de distribución desde el siglo XIX (Sáez 2010, Sáez *et al.* 2010). Por ello, se revela necesario el establecimiento de bases científicas para una gestión adecuada de la especie, contemplándose como un objetivo prioritario el estudio genético de sus poblaciones.

En la actualidad, los principios y métodos que rigen los programas de conservación han sufrido una transformación considerable. La aplicación de técnicas moleculares a la biología de la conservación ha cambiado el concepto de la unidad de conservación sobre la que se debe actuar. Las técnicas moleculares permiten profundizar en el estudio de la genética de poblaciones y definir unidades poblacionales que deban ser conservadas por sus características genéticas singulares. Por lo tanto, los esfuerzos de conservación se dirigen a los diferentes linajes evolutivos existentes dentro de una especie. La identificación de Unidades con Significación Evolutiva (*Evolutionarily Significant Units*, ESUs, Waples 1991) incluye la recopilación de datos genéticos y ecológicos, así como su análisis para determinar las relaciones jerárquicas entre las poblaciones. En la práctica, las decisiones de conservación deben tener en cuenta también los aspectos económicos, sociales y legales, lo que lleva a definir las Unidades Operativas de Conservación (*Operational Conservation Units*, OCUs, Doadrio *et al.* 1996a, Dodson *et al.* 1998) que engloban los requerimientos biológicos y los aspectos socioeconómicos. Por otra parte, los estudios de variabilidad genética han sido imprescindibles para poder establecer planes de recuperación de distintas especies continentales en España

(Planelles-Gomis 1999, Machordom y Perdices 2001), y en especial de la Trucha Común (Almodóvar *et al.* 2002, Machordom *et al.* 1999, Araguas *et al.* 2009).

El objetivo principal del presente capítulo es evaluar y cuantificar la variabilidad genética de las poblaciones suribéricas de Trucha Común, tanto a nivel intra como interpoblacional. Los resultados obtenidos podrán ser empleados para caracterizar el nivel de estructuración presente e intentar reconstruir la historia demográfica de la especie en el sur de Península Ibérica. A partir de los resultados obtenidos se evaluará el estado de conservación de la especie en el sur de la Península Ibérica, proponiéndose un conjunto de pautas de gestión que se puedan aplicar a futuros planes de ordenación de la pesca y que permitan una recuperación de las poblaciones autóctonas y el uso sostenido de los recursos pesqueros (Capítulo VII).

IV.2. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.2.1. Análisis de laboratorio

IV.2.1.1. Extracción de ADN

El ADN extraído en el capítulo III fue empleado en el estudio de la diversidad genética de la Trucha Común, desarrollado en el presente capítulo de la Tesis.

IV.2.1.2. Amplificación y genotipado de la región control mitocondrial

Con el fin de cuantificar la diversidad genética mitocondrial nativa se amplificó la secuencia completa de la región control o D-loop de 445 ejemplares de Trucha Común (Anexo II) homocigotos para el alelo *LDH-CI*100* analizado previamente (Capítulo III), siempre que fuera posible. En aquellas poblaciones que no presentaran ejemplares autóctonos para el locus *LDH-CI**, se amplificaron los ejemplares *LDH-CI*90/100* descartando, posteriormente, los haplotipos alóctonos encontrados.

La región control fue amplificada mediante PCR empleando los cebadores PST (5'-CCCAAAGCTAAAATTCTAAAT-3') (Shedlock *et al.* 1992) y FST (5'-GCTTTAGTTAAGCTACGC-3') (Lee *et al.* 1995). Estos oligonucleótidos hibridan específicamente con las regiones conservadas codificantes para ARNt^{Pro} y ARNt^{Phe}, respectivamente. La reacción de PCR se realizó para cada individuo en un volumen de 50 µl con concentraciones finales de 1X de tampón de PCR libre de magnesio, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada cebador, 0,5 U de enzima *Biotools HotSplit DNA Polymerase* (Biotools, Madrid, España) y 100 ng de ADN. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) utilizando un programa de 95°C 5 minutos, 30 ciclos de 95°C 1 minuto, 52°C 1 minuto y 72°C 1 minuto, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. El fragmento amplificado fue visualizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La secuenciación de la región D-loop se realizó en ambas direcciones en un secuenciador automático *ABI PRISM 3730* (Applied

Biosystems), utilizando el producto de amplificación previamente purificado con el kit de purificación *BIOCLEAN DNA Purification Columns* (Biotools, Madrid, España).

IV.2.1.3. Amplificación y genotipado de loci microsatélites

El número de ejemplares analizados en el Capítulo III se aumentó a 1330 individuos mediante la inclusión de 440 truchas para poder tener datos de todos los ríos analizados en el sur de la Península Ibérica. El número de ejemplares y las localidades analizadas están descritos en el Anexo II. Para la selección de las localidades a analizar se siguieron criterios de fragmentación poblacional, introgresión genética y número de ejemplares disponibles. Por un lado, se analizaron las muestras procedentes de las localidades de cada río muestreadas más aguas arriba, incluyendo aquellas localidades situadas aguas abajo que estuvieran aisladas debido a la presencia de saltos infranqueables naturales o artificiales (dique, azud o embalse). Siguiendo este criterio, y siempre que se dispusiera de suficientes muestras, se descartaron de estos análisis aquellas poblaciones que presentaran índices de introgresión elevados (frecuencia del alelo *LDH-CI*90* mayor del 30%, Capítulo III), poblaciones con un número de truchas inferior a 10 ejemplares o aquellas localidades que no estuvieran aisladas por saltos infranqueables.

Los cebadores y protocolos de amplificación empleados están descritos en el Capítulo III.2 de la presente Tesis.

IV.2.2. Análisis de datos

IV.2.2.1. Asignación de líneas evolutivas e identificación de haplotipos

Las secuencias obtenidas para la región D-loop fueron visualizadas con ayuda del programa *Chromas Lite v.2.01* (Technelysium Pty Ltd, <http://www.technelysium.com.au>) y posteriormente alineadas usando el programa *ClustalX v.2.1* (Larkin *et al.* 2007). Los alineamientos obtenidos fueron visualizados y editados con *Geneious Pro v.4.8.3* (Drummond *et al.* 2009). Las secuencias editadas fueron realineadas en ClustalX y la identificación de los distintos haplotipos presentes en las localidades estudiadas se llevó a cabo usando el programa *DnaSP v.5.10.01* (Librado y Rozas 2009).

La nomenclatura utilizada para los haplotipos asignados consistió en cuatro letras. Las dos primeras se corresponden a las líneas europeas definidas a partir de la región D-loop de la Trucha Común: *Atlántica* (**AT**), *Adriática* (**AD**) y *Mediterránea* (**ME**) (Bernatchez *et al.* 1992). Las dos últimas letras mostradas en subíndice, representan las iniciales de las líneas evolutivas previamente descritas en la Península Ibérica por Machordom *et al.* (2000) y Suárez *et al.* (2001): *Noribérica* o *Cantábrica* **NI**, *Duero* **DU**, *Suratlántica* o *Tajo* **SA**, *Suribérica* o *Andaluza* **SI** y *Mediterránea-Ibérica* o *Mediterránea* **MI**; seguidos de un número que simboliza las diferentes formas encontradas. Es decir, **AD_{SI}1** es el primer haplotipo para la región control detectado en nuestro laboratorio perteneciente al linaje **AD** definido por Bernatchez *et al.* (1992) y a la línea *Suribérica* o *Andaluza* **SI** descrita en Machordom *et al.* (2000) y Suárez *et al.* (2001). Los haplotipos procedentes de piscifactoría fueron incluidos dentro de la línea *Atlántica*

(AT) *sensu* Bernatchez *et al.* (1992) y codificados como *Exótico* (AT_{EX}), permitiendo distinguir dichas secuencias de los linajes ibéricos *Atlántico-Noribérico* (AT_{NI}) y *Atlántico-Sureuropeo* (AT_{SA}).

IV.2.2.2. Caracterización de loci microsatélites

Los programas empleados para el genotipado y la detección de alelos nulos en los loci analizados son indicados en el capítulo III.2 de la presente Tesis.

IV.2.2.3. Diversidad genética intrapoblacional

La diversidad genética se utiliza para describir la variación heredable encontrada a nivel de individuo, población o especie. Desde un punto de vista amplio, la diversidad genética tiene dos componentes: riqueza y equidad. La riqueza es una estima de abundancia, mientras que la equidad indica cómo esta variación se encuentra distribuida en el espacio o en el tiempo. Las medidas de diversidad genética en los ríos suribéricos se calcularon a nivel nuclear y mitocondrial, estudiando tanto la variabilidad detectada entre los haplotipos de la región D-loop como las frecuencias alélicas de los loci microsatélites. Para ello, por una parte se estimaron, a nivel mitocondrial, tanto las frecuencias haplotípicas como los parámetros de diversidad haplotípica (H , Nei 1987) y nucleotídica (π_n , Nei 1987, Tajima 1993). Por otra parte, se evaluó la diversidad genotípica nuclear analizando tanto los parámetros número de alelos (A), riqueza alélica (A_R), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e) e índice de fijación o endogamia poblacional (F_{IS} , Weir y Cockerham 1984), como la distribución de las frecuencias alélicas encontradas.

En primer lugar, a nivel mitocondrial las diversidades haplotípicas y nucleotídicas, así como sus varianzas asociadas, se calcularon utilizando el programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.2. La diversidad haplotípica se define como la probabilidad de que dos alelos o haplotipos escogidos al azar de una muestra, sean distintos. La diversidad nucleotídica es un índice, análogo a la diversidad génica de Nei pero a nivel nucleotídico, que describe la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos, escogidos al azar entre un conjunto de haplotipos, sean distintos. La π_n puede calcularse como el número medio de diferencias entre pares de haplotipos dividido por la longitud en pares de bases de la secuencia estudiada.

Por otra parte, la diversidad genotípica nuclear se estimó calculando el número de alelos y la riqueza alélica por locus y río con el programa *FSTAT* v.2.9.3. (Goudet 1995). La riqueza alélica se define como el número medio de alelos por locus, cuantificando el total de alelos distintos detectados en cada uno de los loci de una población. Debido a que A_R es dependiente del tamaño de muestra se ajustó fijando el valor de al menor número de alelos detectado en los ríos de estudio. Los valores de heterocigosis media observada y esperada según la ley de equilibrio de H-W fueron calculados con el programa *GENETIX* v.4.05.2. (Belkhir *et al.* 2004). Si no existe cruzamiento al azar, la frecuencia de heterocigotos observados en la población será distinta a la esperada en equilibrio. Para cada locus dado, la desviación observada será indicada mediante el índice de endogamia F_{IS} , calculado con el programa *GENETIX* v.4.05.2. El posible

desvío del equilibrio de H-W de cada locus se analizó por medio de un test exacto de probabilidad empleando el programa *GENEPOP* v.4.1 (Rousset 2008). En el caso de existir diferencias, éstas podrían deberse a un déficit o a un exceso en el número de individuos heterocigotos detectados, lo cual podría indicar una cierta estructuración de la población, fenómenos de endogamia o un proceso de hibridación. Por último, se describió el patrón de distribución de las frecuencias alélicas por medio de histogramas. Cada locus fue clasificado como unimodal, bimodal o multimodal; excluyendo los alelos exóticos y aquellas variantes con frecuencias iguales o inferiores al 5%.

IV.2.2.4. Diferenciación genética interpoblacional

Los parámetros de diversidad genética estiman la cantidad de variación que se encuentra dentro de una población, mientras que los análisis de diferenciación genética describen cómo se encuentra esta variación distribuida entre las distintas poblaciones. Las medidas de diferenciación y estructura genética en los ríos suribéricos se estimaron a nivel nuclear y mitocondrial. Para ello, las poblaciones fueron subdivididas en localidades, ríos y cuencas; permitiendo realizar un análisis jerarquizado y estimar la presencia de diferenciación genética a estos niveles. En primer lugar, para el estudio de la diferenciación genética interpoblacional se estimaron tanto el índice de fijación F_{ST} (Weir y Cockerham 1984) a nivel mitocondrial, como los índices R_{ST} (Slatkin 1995) y F_{IS} a partir de las frecuencias alélicas nucleares. Por otro lado, la posible estructura poblacional presente se estimó mediante el método de análisis de la varianza molecular (*Analysis of molecular variance*, AMOVA, Excoffier *et al.* 1992), evaluando finalmente la estructura poblacional a nivel nuclear mediante el método de agrupación bayesiano utilizando el programa *STRUCTURE*.

Por una parte, para cada par de poblaciones comparadas se estimaron los valores de F_{ST} corregidos con el modelo Tamura y Nei (TrN, Tamura y Nei 1993), empleando el programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.2. Este modelo corrige las sustituciones múltiples presentes en una misma posición de una secuencia que son debidas a su rápida tasa de cambio, teniendo en cuenta las diferencias entre las distintas tasas de sustitución entre los nucleótidos (transiciones entre purinas, entre pirimidinas y transversiones) y la desigualdad de las frecuencias nucleotídicas. El índice F_{ST} mide la divergencia interpoblacional describiéndola como la reducción de heterocigotos dentro de una población respecto a la población total debido a procesos de selección o deriva. Este índice oscila entre cero, si no existe divergencia genética, y uno, si hay fijados alelos distintos. Por otra parte, asumiendo un modelo de mutación por pasos (*Stepwise mutation model*, SMM) (Valdés *et al.* 1993) para los loci microsatélites, se calculó la divergencia entre pares de poblaciones utilizando los índices R_{ST} empleando el programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.2. Este índice, análogo al F_{ST} , se basa en la suma cuadrática de la diferencia entre los tamaños de los alelos, siendo más informativo que el índice F_{ST} para los loci microsatélites (Balloux y Lugon-Moulin 2002, Balloux y Goudet 2002). Los valores de significación fueron obtenidos por permutación (1000 réplicas) de la matriz de frecuencias alélicas, con y sin corrección del nivel de significación aplicando Bonferroni (Rice 1989). La desviación observada del equilibrio de H-W a nivel nuclear se analizó examinando el

coeficiente de endogamia F_{IS} (Weir y Cockerham 1984) con el programa *GENETIX* v.4.05.2. Este índice describe la divergencia existente entre la heterocigosis observada y la esperada dentro de una población asumiendo panmixia.

Por otro lado, para establecer y cuantificar el nivel de estructuración geográfica de las poblaciones de estudio fue empleado el método de AMOVA, usando el programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.2 tanto a nivel mitocondrial como nuclear. Los estadísticos obtenidos (Φ) son análogos a los estadísticos F de Wright, pudiendo cuantificar qué porcentaje de la varianza total se debe a diferencias entre grupos y qué porcentaje a diferencias dentro de los grupos generados. Este análisis permite dividir el total de la varianza genética encontrada en tres componentes: la variación producida como producto de las diferencias genéticas entre individuos de una misma población (Φ_{ST}), la variación debida a diferencias genéticas entre poblaciones de un mismo grupo (Φ_{SC}) y la variación producida por diferencias entre grupos de poblaciones (Φ_{CT}). El cálculo de la significación de las comparaciones por pares entre poblaciones se estimó mediante permutaciones no paramétricas (1000 réplicas) de la matriz de datos de la región control y de loci microsatélites.

Finalmente, los datos de alelos de microsatélites se emplearon para estimar la estructura poblacional empleando el método de agrupación bayesiano implementado en el programa *STRUCTURE* v.2.3.3. (Pritchard *et al.* 2000). Asumiendo que las poblaciones se encuentran en equilibrio H-W, este programa asigna a cada individuo de una muestra a una población de manera probabilística (q), sin ser necesario definir previamente la localización geográfica de dichos individuos. Los resultados obtenidos permiten estimar la presencia de estructuras genéticas interpopulacionales, identificar el número de poblaciones parentales genéticamente distintas o grupos (K), asignar estadísticamente cada individuo a una población parental ($Ln P(D)$) y estimar la proporción de mezcla que tiene el genoma de cada muestra de las poblaciones parentales (q). A pesar de que se pueden encontrar poblaciones con individuos de orígenes distintos debido a la introducción de alelos alóctonos, las frecuencias alélicas presentes en las poblaciones actuales son, en términos generales, el reflejo de la existencia de flujo génico entre ellas a lo largo de su historia evolutiva. Dadas las características de las poblaciones y agrupamientos estudiados para la Trucha Común, se consideró un modelo de mezcla poblacional y de frecuencias alélicas correlacionadas, ya que los marcadores no presentaron desequilibrio de ligamiento y las variables alélicas no son necesariamente independientes debido a que presentan un ancestro común. *A priori* se desconoce el nivel de estructuración, por lo que se analizaron 10 simulaciones para cada valor de K comprendido entre 1 y 10, obteniendo 100 simulaciones a partir de cada matriz de datos. Para cada simulación fueron aplicadas 30.000 interacciones para el “burn-in period” seguidos de 1.000.000 de interacciones adicionales (number of MCMC). El número de unidades genéticas K , se estimó siguiendo las recomendaciones de Pritchard *et al.* (2010) a partir de un estudio de simulación de Evanno *et al.* (2005). La prueba de Evanno está basada en la estimación *ad hoc* del ΔK , el cual se fundamenta a su vez en la tasa de cambio de la probabilidad logarítmica dada por el programa *STRUCTURE* entre los sucesivos valores de K de las simulaciones generadas. Una vez definido cada valor de K , las matrices fueron reanalizadas empleando 30.000 interacciones para el “burn-in period” seguidos de 5.000.000 de interacciones adicionales (number of MCMC), asignando cada

ejemplar a una población parental determinada si la proporción del genoma (q) para ese grupo era superior a 0,65 (65%).

IV.2.2.5. Distancia genética interpoblacional

La comparación entre poblaciones consiste básicamente en la cuantificación de las diferencias existentes entre las poblaciones comparadas a partir de la información genética o geográfica, entre otras. En primer lugar, se calcularon y representaron en fenogramas las distancias genéticas mitocondriales y las nucleares entre los ríos analizados. A continuación, las distancias genéticas nucleares entre todos los pares de ejemplares estudiados se estimaron y mostraron a través de árboles sin raíz. Por último, se representaron las matrices de distancias genéticas F_{ST} y R_{ST} empleando un análisis de componentes principales (*Principal component analysis*, PCA).

Las diferencias genéticas mitocondriales entre los ríos analizados se estimaron a partir de una matriz de distancias corregida con el modelo TrN y generada con el programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.2. Por otro lado, a nivel nuclear se utilizó una matriz de frecuencias génicas de loci microsatélites empleando el índice de distancias de Nei (Nei 1972) y el modelo de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza y Edwards 1967), incluidos en el paquete de inferencia filogenética *PHYLP* v.3.69. (Felsenstein 2010). El índice de Nei se basa en un modelo evolutivo donde la variación es atribuida principalmente a la acción de la mutación y la deriva genética, asumiendo que los marcadores empleados no están sujetos a la acción de la selección natural. La distancia de Nei (D_A) se ajusta al modelo de alelos infinitos (*Infinite Alleles Model*, IAM), asume una tasa de mutación al azar constante e igual para todos los loci, un equilibrio entre la mutación y la deriva genética (equilibrio mutación-deriva) y un tamaño efectivo poblacional constante a lo largo de las generaciones. Por otro lado, el índice de Cavalli-Sforza y Edwards (D_C) asume que las diferencias entre las poblaciones no provienen de mutaciones sino que son consecuencia de la acción de la deriva genética. Además no considera que el tamaño efectivo poblacional se haya mantenido constante en el tiempo sino que aumenta linealmente por la acción de la deriva genética.

Una vez generada cada matriz, las relaciones interpoblacionales obtenidas se representaron por medio de fenogramas, empleando el método de inferencia del vecino más próximo (*Neighbor joining*, *NJ*) que se implementó en el paquete *PHYLP* v.3.69. El método algorítmico de *NJ* generará un único árbol que no será necesariamente el “árbol verdadero” (Saitou y Nei 1987), utilizando el criterio de mínima evolución para agrupar, de dos en dos, aquellas poblaciones (*neighbors*) que presenten la menor distancia genética entre ellas. El soporte de cada rama del fenograma se estimó generando 1.000 réplicas de cada matriz de datos, obteniendo un árbol consenso con el programa *CONSENSE* incluido en el paquete *PHYLP* v.3.69.

En segundo lugar, las distancias genéticas entre los ejemplares fueron estimadas a partir de una matriz de frecuencias génicas de loci microsatélites empleando el modelo de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza y Edwards 1967) y el método de agrupamiento de *NJ* empleando el

programa *POPULATIONS* v1.2.32. (Langella 1999). El soporte de cada rama del fenograma fue estimado generando 1.000 réplicas de cada matriz de datos y visualizado con el programa *FigTree* v1.2. (Rambaut 2008).

Finalmente, las matrices de distancias genéticas F_{ST} y R_{ST} fueron representadas gráficamente utilizando el análisis de PCA, empleando el programa *GENALEX* v. 6.3 (Peakall y Smouse 2006). Este análisis multivariante consisten en una representación espacial que trata de visualizar, sobre un mapa, un conjunto de puntos (en nuestro caso poblaciones, ríos o cuencas) cuya posición relativa se desea analizar en un espacio bidimensional. Los diagramas obtenidos pueden interpretarse en términos de similitud para patrones y grupos, y describir las posiciones de cada punto en relación a cada componente empleado.

IV.2.2.6. Aislamiento poblacional por distancia

Cuando la deriva genética y la migración están en equilibrio en una población se espera que las distancias geográfica y genética entre las poblaciones (Slatkin 1993) estén relacionadas positivamente, de tal manera que se observa un patrón de estructura genética basado en el aislamiento por distancia (*Isolation by Distance*, IBD). Para estimar la existencia de diferenciación geográfica en la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica, se compararon las matrices de distancia genética F_{ST} y R_{ST} , y distancia geográfica entre los ríos suribéricos mediante un test de Mantel (Mantel 1967) por medio del programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.2. La distancia geográfica poblacional fue calculada como distancia lineal, en kilómetros, entre las poblaciones siguiendo el curso natural de cada río. Para verificar la homogeneidad de varianzas y distribución normal de los datos se utilizaron los test de Levene (Levene 1960) y Shapiro-Wilk (Shapiro *et al.* 1968), implementados en el programa *STATISTICA* v.8. En aquellos casos en que la distribución de los datos no se ajustó a una distribución normal se realizó una transformación logarítmica de la matriz.

IV.2.2.7. Historia demográfica

El estudio de la historia demográfica poblacional permite inferir aquellos procesos demográficos recientes que puedan haber sufrido las poblaciones y que han conducido a la estructuración y distribución actual de las poblaciones. Los ríos suribéricos se encuentran altamente fragmentados, por lo que las poblaciones fueron subdivididas en localidades, ríos y cuencas, lo que permite estimar la presencia de diferentes historias demográficas a estos niveles. En primer lugar, para cada población se estimaron las pruebas de neutralidad de Tajima (D , Tajima 1989), los estadísticos propuestos por Fu y Li (D^* y F^* , Fu y Li 1993) y la prueba de Fu (F_s , Fu 1997) a partir de las frecuencias haplotípicas, seguido de un estudio de la distribución de *Mismatch* entre pares de haplotipos de la región control. Por otro lado, los posibles cambios temporales en la frecuencia de heterocigotos se estimaron mediante el programa *BOTTLENECK* v.1.2.02. (Cornuet y Luikart 1996), permitiendo detectar la presencia de cuellos de botella o expansiones poblacionales recientes a nivel nuclear.

IV.2.2.7.1. Pruebas de neutralidad

Se realizaron para cada población cuatro tests de neutralidad basados en la teoría de la coalescencia. Estas pruebas permiten conocer si la variabilidad detectada entre un grupo de secuencias es debida a la selección neutral, permitiendo detectar expansiones demográficas pasadas. A partir de las frecuencias haplotípicas obtenidas para la región D-loop se simuló la estructura poblacional utilizando los estadísticos D , D^* , F^* y F_s en el programa *DnaSP* v.5.10.01. En todos los análisis se calculó la significación estadística mediante 10.000 simulaciones asumiendo neutralidad y equilibrio mutación-deriva a nivel poblacional, y utilizando un algoritmo de simulación de coalescencia adaptado de Hudson (1990) en el programa *DnaSP* v.5.10.01.

El estadístico de Tajima D compara las diferencias entre el número de posiciones polimórficas detectado en las secuencias analizadas y el número medio de diferencias nucleotídicas entre las secuencias comparadas dos a dos. El parámetro D puede oscilar entre valores negativos, indicando un desvío de la neutralidad debido a un exceso de polimorfismos con baja frecuencia, o positivos si la desviación es generada por frecuencias alélicas intermedias. Cuando las secuencias analizadas han sufrido un evento de expansión poblacional o cuellos de botella, la prueba de neutralidad de Tajima presentará valores significativos y negativos para el parámetro D . Por otro lado, valores significativos y positivos de D ponen de manifiesto la presencia de estructuración poblacional.

Los estadísticos D^* y F^* verifican que todas las mutaciones presentes en las secuencias analizadas sean selectivamente neutras, prediciendo el número de cambios nucleotídicos esperados en las ramas de una genealogía de secuencias. Ambos estadísticos se basan en las diferencias entre el total de mutaciones “únicas” o *singletons*, de tal manera que D^* se estima a partir del número total de cambios nucleotídicos y F^* a partir del número medio de diferencias nucleotídicas entre cada par de secuencias. Los parámetros D^* y F^* presentarán valores negativos debido a un exceso de mutaciones en las ramas externas, es decir, un exceso de polimorfismos únicos o de baja frecuencia. Por el contrario, valores positivos ponen de manifiesto un exceso de mutaciones en las ramas internas de la genealogía de secuencias, es decir, un exceso de polimorfismos con frecuencias intermedias. Si las secuencias analizadas han sufrido un evento de expansión poblacional o cuellos de botella, las pruebas de neutralidad de Fu y Li presentarán valores significativos y negativos.

Las pruebas de neutralidad basadas en las frecuencias haplotípicas son más sensibles para la detección de eventos de expansión en marcadores genéticos no recombinantes (Ramírez-Soriano *et al.* 2008). El test de neutralidad de Fu evalúa la probabilidad de observar un número de haplotipos igual o inferior en una muestra de tamaño determinado. Este parámetro está condicionado por el número medio de diferencias entre pares de haplotipos observados. Si la población analizada presenta un exceso de haplotipos, el estadístico F_s será negativo. Si las poblaciones analizadas han sufrido un evento de expansión poblacional o de cuello de botella recientemente, el estadístico F_s presentará valores significativos y negativos. Dado que la prueba de neutralidad de Fu asume que la recombinación es igual a cero, valores significativos y negativos de F_s simplemente podrían indicar la presencia de un exceso de haplotipos originados

por recombinación, por lo que no debería emplearse cuando los niveles de recombinación son desconocidos (Ramírez-Soriano *et al.* 2008).

IV.2.2.7.2. Distribución de las diferencias genéticas entre pares de poblaciones

El estudio de la distribución de las diferencias genéticas entre pares de poblaciones (*Pairwise Mismatch Distributions*) ha sido y está siendo utilizado para inferir posibles acontecimientos de expansión demográfica o de dinámica estacionaria en la historia reciente, tanto en poblaciones de Trucha Común (Bernatchez 2001, Susnik *et al.* 2007, Cortey *et al.* 2009), como en otras especies no relacionadas (Salzburger *et al.* 2003, Novo *et al.* 2009, Babbucci *et al.* 2010). Los episodios de crecimiento y estabilidad poblacional dejan señales características en la distribución de las diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias. Basándose en las diferencias entre dos secuencias (o individuos) y suponiendo una tasa evolutiva previamente definida, el uso de un modelo coalescente permite la reconstrucción filogenética desde el momento actual hasta el ancestro común más probable, con lo que se puede inferir la historia demográfica de la población estudiada (Slatkin y Hudson 1991, Rogers y Harpending 1992). Las diferencias genéticas entre pares de poblaciones pueden ser representadas gráficamente mediante un histograma. Así, si el tamaño de la población se encuentra en equilibrio demográfico, el número de diferencias entre pares de haplotipos tendrá una distribución que convergerá en una curva de equilibrio (Watterson 1975), normalmente multimodal. En cambio, si la población ha sufrido alguna perturbación, el histograma obtenido presentará una distribución unimodal similar a una distribución de Poisson, lo que pondría de manifiesto una reciente expansión demográfica en las poblaciones analizadas o unos altos niveles de migración desde poblaciones próximas (Rogers y Harpending 1992, Ray *et al.* 2003, Excoffier 2004).

Con el objetivo de estudiar las posibles expansiones poblacionales de la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica se llevó a cabo un estudio de la distribución de *Mismatch* entre pares de haplotipos de la región D-loop empleando el programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.2., siempre que el tamaño de las poblaciones lo permitiera. Los datos de cada histograma obtenido fueron comparados asumiendo un modelo de expansión poblacional repentina (hipótesis nula). Las distribuciones *Mismatch* observadas se analizaron gráficamente y se compararon estadísticamente con una prueba de ji-cuadrado (χ^2), aceptándose que las diferencias no son debidas al azar si dicho estadístico fuera significativo (Zink y Blackwell-Rago 2000). Cada modelo fue validado utilizando 1.000 réplicas o simulaciones con el fin de obtener los intervalos de confianza para cada modelo, la desviación de la suma de los cuadrados entre la distribución observada y esperada, la media y la varianza observadas en la distribución y el índice de irregularidad de Harpending (*Raggedness Index*, r) (Harpending 1994). Este índice, inicialmente desarrollado para analizar secuencias de ADN mitocondrial, permite cuantificar las irregularidades de la distribución *Mismatch* observada, aunque sólo puede ser calculado si la varianza observada es superior a la media de la distribución. La distribución de las diferencias genéticas entre pares de poblaciones se utilizó también para estimar, mediante simulaciones con el programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.2., el tiempo de expansión en unidades mutacionales (τ) así

como el tamaño poblacional antes (θ_0) y después (θ_1) de las principales explosiones poblacionales (Rogers y Harpending 1992). El modelo de Rogers y Harpending (1992) contempla tres parámetros: tamaño efectivo poblacional inicial de las hembras (Ne_0), tamaño efectivo poblacional de las hembras posterior al crecimiento o disminución de la población inicial (Ne_1), y momento en el que se inició la expansión poblacional, estimado como el número de generaciones entre Ne_0 y Ne_1 (t). A partir de estos parámetros, conociendo la tasa de mutación (μ) entre los haplotipos analizados, se puede calcular θ_0 ($\theta_0 = 2Ne_0\mu$), θ_1 ($\theta_1 = 2Ne_1\mu$) y τ ($\tau = 2t\mu$). De acuerdo con este modelo, asumiendo que θ_1 es infinito, es posible calcular θ_0 y τ . La relación $\tau = 2ut$ se aplicó para estimar el tiempo de expansión por generación t para los distintos agrupamientos realizados. El valor de u se calculó a partir de la relación $u = 2\mu k$, donde μ es la tasa de mutación por nucleótido y k el número de nucleótidos del fragmento analizado. Para ello se consideró una tasa de sustitución nucleotídica del 1 y 2% por millón de años, estimada para la región control (Bernatchez 2001).

IV.2.2.7.3. Cuellos de botella

El análisis demográfico se realizó utilizando el programa *BOTTLENECK* v.1.2.02. Este programa detecta reducciones recientes y bruscas en el tamaño efectivo de una población basándose en la comparación entre la heterocigosis observada y esperada si la población se encontrara en equilibrio de H-W mediante un proceso de simulación de coalescencia. Los cuellos de botella generan una reducción inicial de la variabilidad genética en las poblaciones, lo que conlleva un exceso temporal de heterocigotos. Esto es debido a que al disminuir bruscamente el tamaño poblacional los “alelos raros” se pierden a una tasa mucho mayor que la heterocigosis. De esta manera, en una población que haya sufrido un cuello de botella reciente, la H_o será mayor que la H_e en equilibrio de H-W (Luikart *et al.* 1998). Las señales producidas por un efecto de cuello de botella son transitorias y detectables durante un periodo de tiempo muy corto, ya que las poblaciones tienden de nuevo al equilibrio. Aunque la variabilidad genética de una población se mide generalmente en términos de heterocigosis, es necesario conocer y comparar el número de alelos por locus. Si este número disminuye drásticamente después de que una población haya sufrido un proceso de cuello de botella, la adaptabilidad de esa población puede quedar limitada aunque su heterocigosis siga siendo elevada (Nei *et al.* 1975). Debido a que no todos los loci de microsatélites se ajustan estrictamente al modelo SMM, los resultados se compararon junto con los del modelo de mutación en dos pasos (*Two-phased model of mutation*, TPM) con una proporción de SMM del 70%. En la medida en que los loci microsatélites mutaron de una manera intermedia entre esos patrones, se definió el modelo TPM en el que se asume que la mayoría de las mutaciones conllevan la ganancia o pérdida de una unidad de repetición, aunque también se produzcan mutaciones de mayor tamaño. Dicho modelo es recomendado cuando la mayor parte de los microsatélites analizados se corresponde con un modelo de mutación IAM, pero existe un pequeño porcentaje que se ajusta a un modelo SMM (Luikart *et al.* 1998). Para detectar si en las poblaciones de estudio existen desviaciones significativas respecto a una hipótesis nula de población estable, se generaron 1.000 réplicas de H_e a partir del número de alelos observados. Los valores de H_e

simulados y calculados se compararon mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon y un test cualitativo (*Mode Shift*). La prueba de Wilcoxon es apropiada para un número moderado de loci (>4) y de individuos (15-30), y utiliza un procedimiento no paramétrico semejante a una *t* de *Student* para muestras pareadas.

IV.2.2.8. Migración y tamaño efectivo poblacional

La dispersión de individuos desde unas poblaciones a otras puede tener un impacto tanto sobre la dinámica ecológica de las poblaciones como sobre sus características genéticas (Broquet y Petit 2009). De hecho, la migración afectará a la distribución espacial de los alelos, permitiendo la existencia de flujo génico entre las poblaciones. Este intercambio de genes puede constituir una nueva fuente de variación genética, minimizar las diferencias genéticas interpopulacionales o modificar el tamaño efectivo poblacional. Por lo tanto, la evaluación espacial de la migración permite comprender el impacto del flujo génico tanto sobre la estructura genética poblacional como sobre el tamaño efectivo de una población, así como detectar barreras físicas y biológicas que dificulten el flujo genético. Así, a partir de los marcadores nucleares se estimó para cada par de localidades su tasa de migración (M) y el porcentaje de ejemplares inmigrantes de primera generación. Finalmente, se calculó el tamaño efectivo poblacional (N_e) a nivel de localidad, río y cuenca.

En primer lugar, a partir de los datos de microstélites se estimó la tasa de migración poblacional empleando el método de coalescencia implementado en el programa *MIGRATE* v.3.2.7. (Beerli 2009). La tasa de migración M se define como m/μ , siendo m la tasa de inmigración interpopulacional por generación y μ la tasa de mutación por generación y locus. Asumiendo un modelo de mutación *browniano*, se construyó una matriz de migración asimétrica y bidireccional empleando el algoritmo de Monte Carlo a partir de 15 cadenas de Markov cortas (10.000 genealogías muestreadas) y cinco largas (100.000 genealogías muestreadas). Para asegurar que las cadenas de Markov convergieran se utilizó la opción “*adaptive heating*” con cuatro de las cadenas (una fría y tres calientes). Cada análisis se repitió tres veces sucesivas, empleando los valores de M obtenidos en la primera y segunda simulación como estimas iniciales para el segundo y tercer análisis, respectivamente. A continuación se realizó una prueba de dispersión poblacional, determinando la posible existencia de migrantes de primera generación entre las localidades analizadas, implementada en el programa *GeneClass2* (Piry *et al.* 2004). A partir de las frecuencias alélicas (Paetkau *et al.* 1995) se estimó para cada ejemplar su origen “local” o “inmigrante” empleando la ecuación $-\log(L_{\text{home}}/L_{\text{max}})$, siendo Λ el cociente entre la verosimilitud de la localidad donde un ejemplar es muestreado respecto a la verosimilitud más elevada encontrada para todas las localidades muestreadas. Para validar los resultados obtenidos a nivel individual se empleó el algoritmo de simulación desarrollado por Paetkau *et al.* (2004), aplicando 10.000 interacciones de MCMC y considerando un nivel de significación del 1%.

Finalmente, dado que el tamaño efectivo poblacional está relacionado con la variación genética, los resultados obtenidos pueden ser empleados para evaluar tanto el efecto de la fragmentación sobre dicha variación como el tipo y la magnitud de los procesos evolutivos no

selectivos que pueden afectar a la población (Frankham *et al.* 2002). Para ello, se estimó N_e empleando el método de desequilibrio de ligamiento (LD) entre loci (Hill 1981) corregido por Waples (2006) para tamaños poblacionales pequeños, utilizando el programa *LDNe* (Waples y Do 2008). Tanto los valores de N_e como sus intervalos de confianza al 95% se estimaron empleando un remuestreo *jackknifing*, para lo que se utilizaron únicamente aquellos alelos que mostraron una frecuencia igual o superior al 5%, corrigiendo así el sesgo provocado por la presencia de “alelos raros”.

IV.3. RESULTADOS

IV.3.1. Estructura genética poblacional en la cuenca del Guadalquivir

IV.3.1.1. Diversidad genética intrapoblacional

En la cuenca del Guadalquivir se detectaron para la región D-Loop tres haplotipos nativos pertenecientes a la línea evolutiva *Adriática-Suribérica* (**AD_{SI}1**, **AD_{SI}4** y **AD_{SI}5**) y cuatro haplotipos de origen alóctono (**AT_{EX}1**, **AT_{EX}2**, **AT_{EX}3** y **AT_{EX}4**), lo que evidencia la presencia de introgresión genética de material genético alóctono en el ADN mitocondrial en algunas de las poblaciones estudiadas. El linaje *Adriático-Suribérico* fue más abundante que la línea evolutiva de origen alóctono, presentando unas frecuencias en la vertiente del 91 y 9%, respectivamente. La elección de muestras para el análisis genético de la región D-Loop se llevó a cabo mediante la selección previa de ejemplares nativos homocigotos para el alelo *LDH-CI*100*, siempre que fuera posible. Por ello, los ejemplares con haplotipos mitocondriales de repoblación no fueron incluidos en los análisis realizados. La distribución geográfica y las frecuencias de cada haplotipo nativo encontrado se muestran en las Figuras IV.1 y IV.2. Excluyendo los haplotipos exóticos, un 64% de los ejemplares fueron clasificados dentro del haplotipo **AD_{SI}1**, que fue detectado en todas las cuencas analizadas. Este haplotipo coincide con la secuencia *Suribérica* **AN2** y el haplotipo **AD_{CS}1** descrito en la vertiente mediterránea ibérica por Suárez *et al.* 2001 y Cortey *et al.* 2004, respectivamente. Por otro lado, las secuencias **AD_{SI}4** y **AD_{SI}5** fueron detectadas en el 18% de las truchas analizadas, presentando una distribución restringida a la cuenca del Genil. Estas secuencias se corresponden con los haplotipos **AD_{CS}5** y **AD_{CS}19**, respectivamente, definidos por Cortey *et al.* 2004 en las cuencas suribéricas del Guadalfeo y Genil. En lo que se refiere a los niveles de diversidad haplotípica y nucleotídica, las cuencas del Alto Guadalquivir y Guadiana Menor presentaron una composición haplotípica nativa, constituida por un único haplotipo (Figura IV.1 y IV.2). Por otro lado, los valores de diversidad haplotípica detectados en la cuenca del Genil fueron elevados ($H = 0,601 \pm 0,022$), mientras que la diversidad nucleotídica mostró unos valores bajos ($\pi_n = 0,001 \pm 0,001$). Finalmente, los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica en la gran cuenca del Guadalquivir fueron intermedios y bajos, respectivamente ($H = 0,527 \pm 0,028$, $\pi_n = 0,001 \pm 0,001$).

Por otro lado, la amplificación de todos los loci microsatélites mostró patrones claros de variación, con dos alelos o variantes genéticas por individuo. Las muestras analizadas fueron

seleccionadas previamente estimando el grado de introgresión de genes alóctonos a través del coeficiente de hibridación q (Capítulo III). Los ejemplares con genotipos exóticos (rango de q 0-0,1) y con niveles altos de introgresión (rango de q 0,101-0,889) fueron excluidos de los análisis poblacionales. Los ocho loci estudiados no mostraron evidencias de alelos nulos ni de “tartamudeo de picos”. En la cuenca del Guadalquivir, el estudio de la diversidad genética nuclear permitió identificar 68 formas alélicas en los ocho loci analizados, detectándose 15 variantes alélicas correspondientes a stocks de piscifactoría (Anexo III). Estos alelos de origen exótico mostraron una baja incidencia en las cuencas suribéricas, a excepción de los alelos Str15*224, Ssa85*110 y Ssa197*140, con frecuencias superiores del 7% en el Guadiana Menor (Figura IV.3).

Los parámetros de variabilidad genética intrapoblacional obtenidos no fueron muy elevados (Tabla IV.1), presentando la cuenca del Alto Guadalquivir unos niveles de diversidad muy inferiores al resto de cuencas, mientras que las cuencas del Guadiana Menor y Genil mostraron unos niveles de diversidad similares. Cabe destacar, que 29 de los 32 análisis mostraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas. En todos los casos, los valores de F_{IS} fueron positivos, mostrando valores igualmente significativos. Dado que no se detectaron alelos nulos, la existencia de diferencias significativas con el equilibrio de Hardy-Weinberg podría indicar una alta diferenciación tanto entre cuencas como dentro de las cuencas en el sur de la Península Ibérica.

Tabla IV.1. Parámetros de diversidad genética poblacional estimados para la Trucha Común en la cuenca del Guadalquivir. Parámetros estimados: número de ejemplares analizados (N), número de alelos (A), riqueza alélica (A_R), alelos privados (P_A), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e) e índice de fijación (F_{IS}). Las desviaciones significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas bajo el equilibrio de H-W son indicadas por medio de asteriscos (Valores de significación: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

		Str15	Str60	Str73	Ssa85	Ssa197	SSOSL417	SSOSL438	BFRO 002	Total
Alto Guadalquivir	N	131	133	128	133	132	118	124	129	135
	A	4	3	4	5	8	8	5	2	4,880
	A_R	3,901	2,999	3,922	4,986	7,893	8,000	5,000	2,000	4,838
	P_A	0,146	0,113	0,389	0,277	1,230	0,566	0,824	0,001	0,440
	H_o	0,519	0,053	0,094	0,120	0,705	0,280	0,557	0,341	0,333
	H_e	0,534	0,073	0,213	0,129	0,776	0,327	0,726	0,428	0,401
	F_{IS}	0,032	0,282**	0,562***	0,074*	0,095*	0,150	0,237***	0,207*	0,161***
Guadiana Menor	N	236	243	234	244	241	231	227	235	238
	A	5	4	8	5	10	11	8	2	6,625
	A_R	5,000	3,982	7,710	4,483	9,477	9,792	7,509	2,000	6,240
	P_A	1,443	0,376	1,069	1,085	1,216	1,031	0,698	0,000	0,860
	H_o	0,555	0,119	0,192	0,262	0,548	0,472	0,480	0,175	0,350
	H_e	0,694	0,166	0,329	0,453	0,773	0,734	0,707	0,491	0,543
	F_{IS}	0,202***	0,283***	0,418***	0,423***	0,294***	0,359***	0,323***	0,646***	0,357***
Genil	N	441	445	444	446	443	420	423	440	451
	A	6	3	6	5	10	14	9	3	7,000
	A_R	5,535	2,955	4,638	4,689	8,747	11,912	7,530	3,000	6,126
	P_A	0,252	0,407	0,295	0,270	1,950	2,538	1,630	0,878	1,030
	H_o	0,209	0,218	0,081	0,114	0,431	0,402	0,251	0,239	0,243
	H_e	0,465	0,223	0,171	0,127	0,695	0,830	0,652	0,484	0,456
	F_{IS}	0,552***	0,022	0,526***	0,097*	0,381***	0,516***	0,617***	0,508***	0,468***
Cuenca del Guadalquivir	N	808	821	806	823	816	769	774	804	824
	A	7	4	9	6	13	16	10	3	8,500
	A_R	7,000	4,000	8,998	6,000	12,939	16,000	10,000	3,000	8,490
	P_A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H_o	0,360	0,162	0,115	0,159	0,510	0,404	0,367	0,236	0,289
	H_e	0,582	0,184	0,227	0,241	0,841	0,819	0,752	0,579	0,528
	F_{IS}	0,382***	0,121**	0,492***	0,34***	0,394***	0,507***	0,512***	0,592***	0,453***

Los histogramas de las frecuencias alélicas mostraron diferentes patrones de distribución dependiendo del microsatélite analizado (Figura IV.3). Excluyendo las variantes alóctonas, los loci Str15 y Ssa85 exhibieron en la gran cuenca del Guadalquivir una distribución unimodal, los microsatélites Str60, Str73, SSOSL417 un patrón bimodal, mientras que los loci Ssa197, SSOSL438 y BFRO 002 mostraron una distribución de frecuencias multimodal más compleja. Las cuencas siguieron un patrón similar al descrito para la cuenca del Guadalquivir, salvo algunas excepciones. De hecho, el 42 % de los loci no mostraron el patrón de distribución de frecuencias alélicas definido globalmente (Figura IV.3). Al comparar las cuencas del Alto Guadalquivir, Guadiana Menor y Genil, fueron detectadas diferencias en las variantes alélicas más frecuentes en cuatro de los loci analizados. De esta manera, los alelos Ssa197*150, SSOSL417*197, SSOSL438*103 y BFRO 002*117 mostraron una mayor frecuencia en las cuencas del Alto Guadalquivir y Guadiana Menor (Figura IV.3), mientras que las variantes Ssa197*162, SSOSL417*203, SSOSL438*97 y BFRO 002*113 fueron las mayoritarias en la cuenca del Genil. Las diferencias entre las variantes mayoritarias fueron debidas a dos o tres saltos mutacionales entre ellas. En la cuenca del Guadalquivir se detectaron nueve variantes alélicas exclusivas de cuenca o conjunto de cuencas. Los alelos Str15*200, Str73*156, Ssa85*118, Ssa197*146 y BFRO 002*109 fueron encontrados únicamente en la cuenca del Genil; mientras que las variantes Str60*96 y Str73*136 se detectaron exclusivamente en el Guadiana Menor. Finalmente, los alelos Str73*138 y SSOSL438*89 mostraron una distribución restringida a las cuencas del Guadiana Menor y Genil.

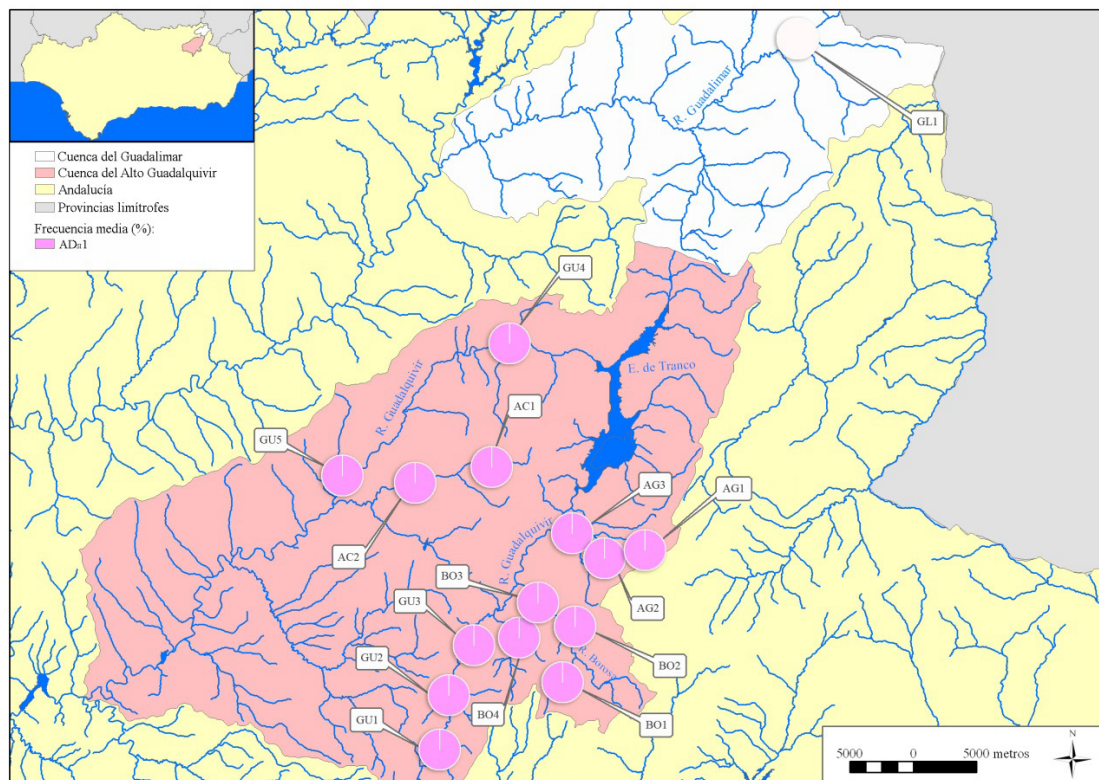


Figura IV.1. Posición geográfica y frecuencia de los diferentes haplotipos nativos de Trucha Común en las cuencas del Alto Guadalquivir, Guadiana Menor y Guadalimar. En blanco se marcan aquellas localidades donde no se detectaron haplotipos nativos.

IV. Diversidad y estructuración genética en el sur de la Península Ibérica

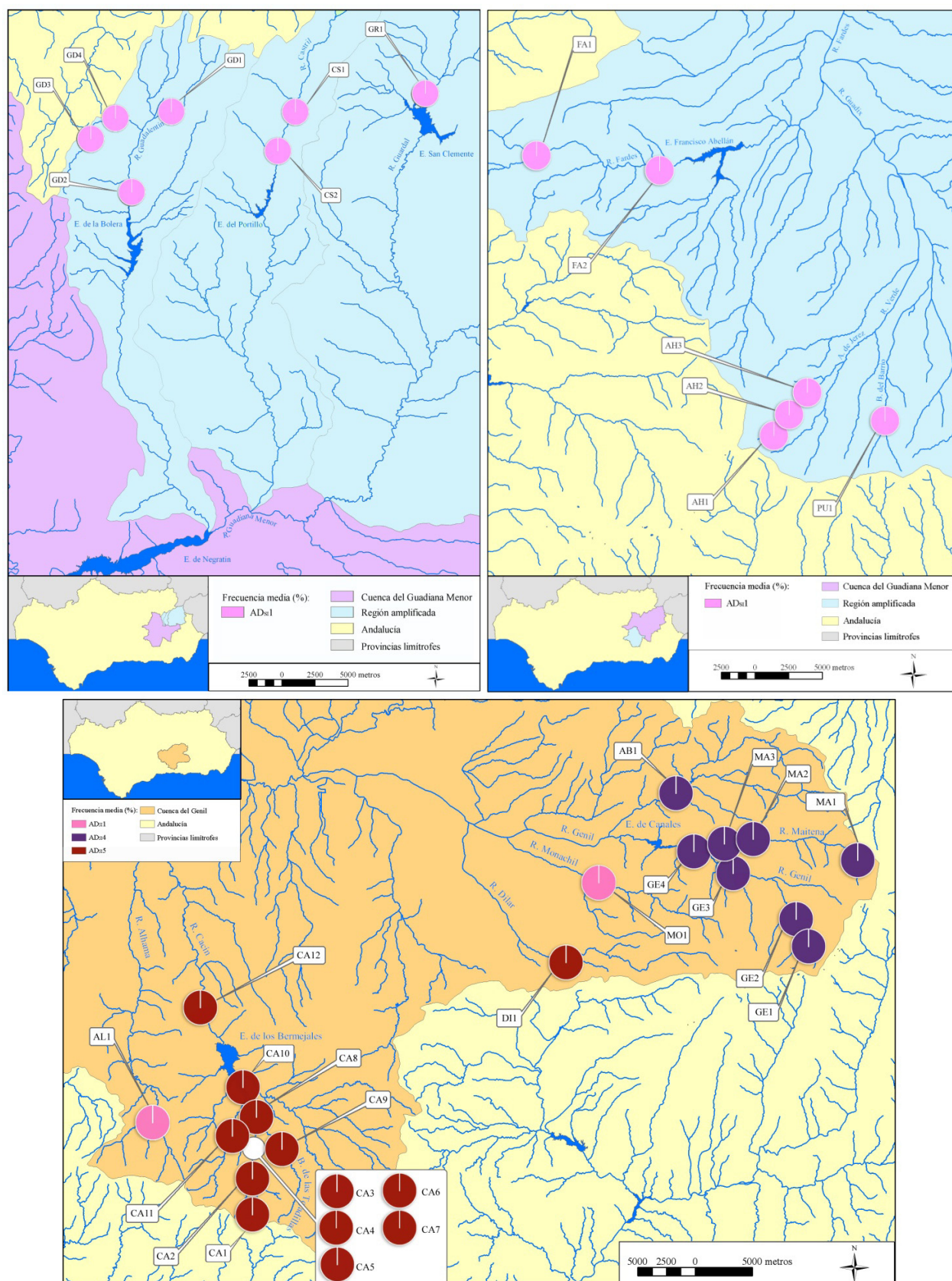


Figura IV.2. Posición geográfica y frecuencia de los diferentes haplotipos nativos de Trucha Común en las cuencas del Guadiana Menor y Genil.

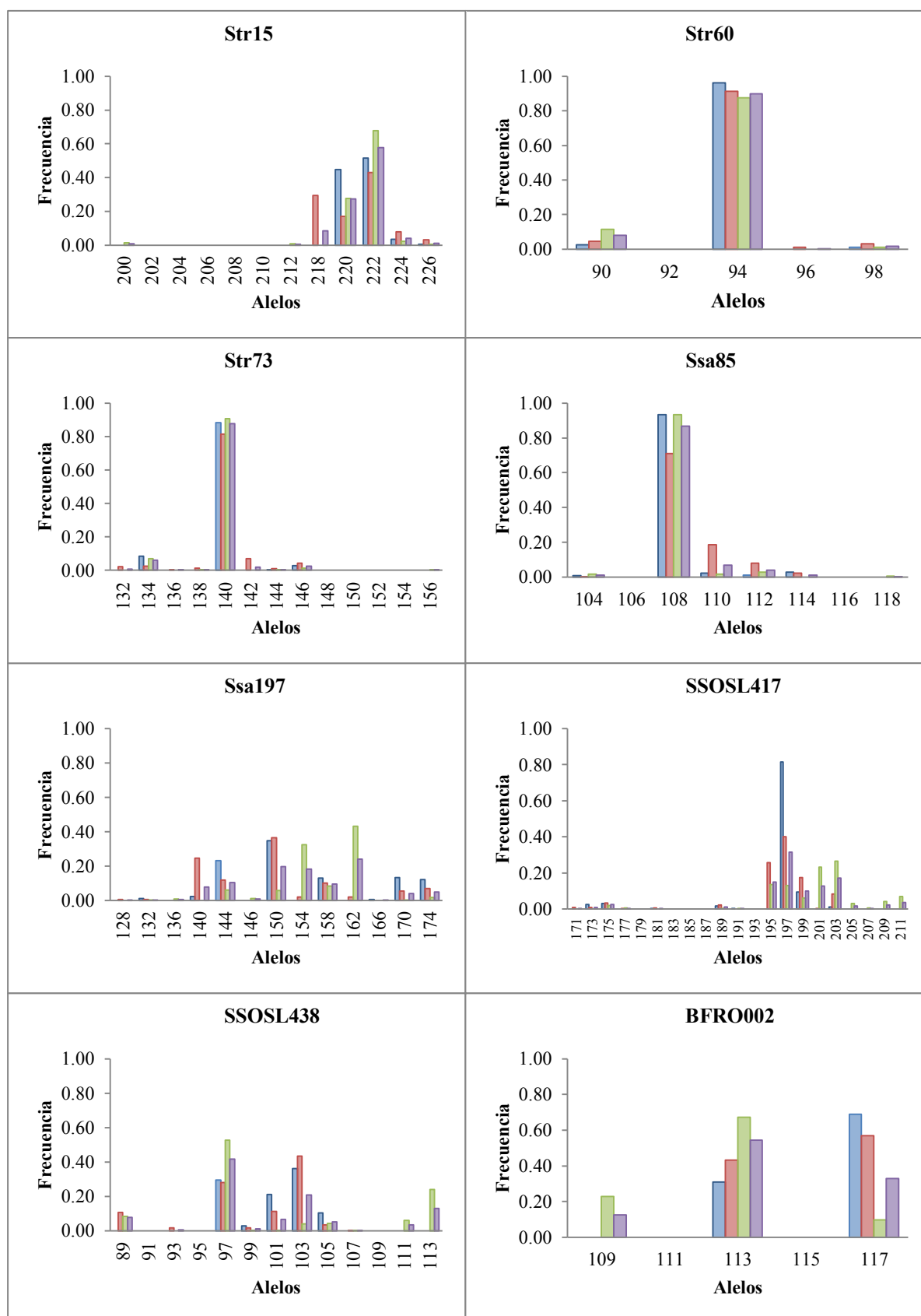


Figura IV.3. Frecuencias alélicas obtenidas para los ocho loci microsatélites analizados en las cuencas del Alto Guadalquivir ■, Guadiana Menor ■ y Genil ■ así como en toda la cuenca del Guadalquivir ■.

IV.3.1.1.1. Diversidad genética intrapoblacional en la cuenca del Alto Guadalquivir

En la cuenca del Alto Guadalquivir se detectó para la región control un único haplotipo nativo perteneciente a la línea evolutiva *Adriática-Suribérica*, mostrando todos los ríos estudiados una composición haplotípica nativa homogénea constituida por el haplotipo **AD_{SI}1** (Figura IV.1).

Por otro lado, el análisis de los ocho microsatélites estudiados permitió identificar 39 variantes alélicas en la cuenca, 13 de los cuales resultaron ser alelos correspondientes a stocks de piscifactoría (Anexo III). Estas formas alélicas de origen exótico mostraron una baja incidencia tanto a nivel de cuenca como de río, con excepción del Guadalquivir I, donde se hallaron los alelos Str15*224, Str60*98, Str73*146, Ssa85*110, Ssa197*132 y *140, SSOSL417*189 y SSOSL438*99 con unas frecuencias alélicas superiores al 5% (Figuras IV.4). A pesar de la presencia de estos alelos foráneos, los niveles de diversidad dentro de los ríos de la cuenca del Alto Guadalquivir no fueron muy elevados (Tabla IV.2), mostrando el Guadalquivir I unos niveles ligeramente superiores al resto generado por la mayor frecuencia y presencia de alelos autóctonos. Finalmente, se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas para tres de las 40 comparaciones analizadas. En todos los casos los valores de F_{IS} fueron positivos, mostrando valores significativos al agrupar los loci analizados en los ríos Guadalquivir I, Borosa y Aguascebas.

En relación a las frecuencias alélicas, excluyendo las variantes autóctonas y aquellos alelos con frecuencias inferiores al 5%, los loci Str15, Str60, Ssa85 y SSOSL417 exhibieron en el Alto Guadalquivir una distribución unimodal, los microsatélites Str73, SSOSL438 y BFRO 002 un patrón bimodal, mientras que el locus Ssa197 mostró una distribución de frecuencias multimodal (Figura IV.4). Dentro de cada río, el 82,5% de los loci mostraron un patrón de distribución de frecuencias alélicas similar al descrito previamente para toda la cuenca del Alto Guadalquivir. Al ser comparadas sus frecuencias alélicas, se detectaron diferencias entre las variantes más frecuentes en tres de los loci analizados. De esta manera, el alelo Str15*220 mostró una mayor frecuencia en los ríos Borosa, Aguasmulas y Guadalquivir II; mientras que la variante *222 fue mayoritaria en el Guadalquivir I y Aguascebas. El locus Ssa197 permitió agrupar a los ríos Borosa, Aguasmulas y Aguascebas; mientras que el microsatélite SSOSL438 mostró unas frecuencias elevadas del alelo *97 en el Guadalquivir I y Aguascebas. Las diferencias entre las distintas formas alélicas mayoritarias fueron debidas a uno o dos saltos mutacionales entre ellas. Por otro lado, cabe destacar los resultados obtenidos en el locus BFRO 002, mostrando los ríos Guadalquivir II y Aguascebas frecuencias próximas al 50% para las dos variantes alélicas encontradas (Figura IV.4). No se detectaron variantes alélicas exclusivas de río dentro de la cuenca del Alto Guadalquivir. Sin embargo, el río Aguascebas presentó un alelo exclusivo dentro de la cuenca del Guadalquivir y compartido con la cuenca del Segura (SSOSL438*203, Capítulo IV.3.3).

IV. Diversidad y estructuración genética en el sur de la Península Ibérica

Tabla IV.2. Parámetros de diversidad genética poblacional estimados para la Trucha Común en los ríos analizados de la cuenca del Alto Guadalquivir. Parámetros estimados: número de ejemplares analizados (N), número de alelos (A), riqueza alélica (A_R), alelos privados (P_A), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e) e índice de fijación (F_{IS}). Las desviaciones significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas bajo el equilibrio de H-W son indicadas por medio de asteriscos (Valores de significación: $*$ = $p < 0,05$, $**$ = $p < 0,01$, $***$ = $p < 0,001$).

		<i>Str15</i>	<i>Str60</i>	<i>Str73</i>	<i>Ssa85</i>	<i>Ssa197</i>	<i>SSOSL417</i>	<i>SSOSL438</i>	<i>BFRO 002</i>	Total
Guadalquivir I	<i>N</i>	23	23	20	22	22	13	17	23	23
	<i>A</i>	4	3	3	5	7	5	5	2	4,250
	<i>A_R</i>	3,382	2,744	2,960	3,809	6,274	4,298	4,684	1,988	3,767
	<i>P_A</i>	0,016	0,038	0,007	0,179	0,335	0,435	0,269	0,000	0,160
	<i>H_o</i>	0,652	0,261	0,250	0,409	0,818	0,462	0,529	0,261	0,455
	<i>H_e</i>	0,595	0,332	0,564	0,417	0,797	0,527	0,694	0,287	0,527
	<i>F_{IS}</i>	-0,075	0,235	0,428**	0,043	-0,004	0,163	0,265*	0,114	0,161**
Borosa	<i>N</i>	30	30	29	30	29	28	28	29	30
	<i>A</i>	2	1	1	2	4	4	4	2	2,500
	<i>A_R</i>	1,506	1,000	1,000	1,155	1,630	1,344	1,734	1,290	1,332
	<i>P_A</i>	0,000	0,000	0,000	0,070	0,000	0,097	0,001	0,000	0,020
	<i>H_o</i>	0,467	0,000	0,000	0,167	0,586	0,286	0,679	0,207	0,299
	<i>H_e</i>	0,498	0,000	0,000	0,153	0,619	0,337	0,721	0,285	0,327
	<i>F_{IS}</i>	0,079	-	-	-0,074	0,070	0,171	0,077	0,291	0,103*
Aguasmulas	<i>N</i>	28	29	29	30	30	30	29	30	30
	<i>A</i>	2	1	2	1	4	2	4	2	2,250
	<i>A_R</i>	1,477	1,000	1,680	1,000	1,697	1,325	1,562	1,398	1,392
	<i>P_A</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<i>H_o</i>	0,464	0,000	0,103	0,000	0,800	0,267	0,483	0,333	0,306
	<i>H_e</i>	0,469	0,000	0,098	0,000	0,685	0,320	0,552	0,391	0,314
	<i>F_{IS}</i>	0,028	-	-0,038	-	-0,151	0,183	0,143	0,164	0,043
Guadalquivir II	<i>N</i>	25	26	26	25	25	24	25	23	26
	<i>A</i>	2	1	3	3	6	5	4	2	3,250
	<i>A_R</i>	1,509	1,000	1,923	1,079	1,823	1,333	1,578	1,510	1,469
	<i>P_A</i>	0,000	0,000	0,056	0,012	0,000	0,200	0,000	0,000	0,030
	<i>H_o</i>	0,560	0,000	0,115	0,080	0,720	0,333	0,440	0,522	0,346
	<i>H_e</i>	0,499	0,000	0,110	0,078	0,806	0,326	0,566	0,499	0,361
	<i>F_{IS}</i>	-0,102	-	-0,011	-0,011	0,127	0,000	0,242	-0,023	0,060
Aguascebas	<i>N</i>	25	25	24	26	26	23	25	24	26
	<i>A</i>	2	2	2	1	6	2	3	2	2,500
	<i>A_R</i>	1,411	1,040	1,972	1,000	1,763	1,125	1,650	1,511	1,434
	<i>P_A</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,154	0,000	0,000	0,000	0,020
	<i>H_o</i>	0,480	0,040	0,042	0,000	0,615	0,130	0,640	0,417	0,296
	<i>H_e</i>	0,403	0,039	0,249	0,000	0,749	0,122	0,637	0,500	0,337
	<i>F_{IS}</i>	-0,171	0,000	0,873**	-	0,197	-0,048	0,015	0,187	0,144*

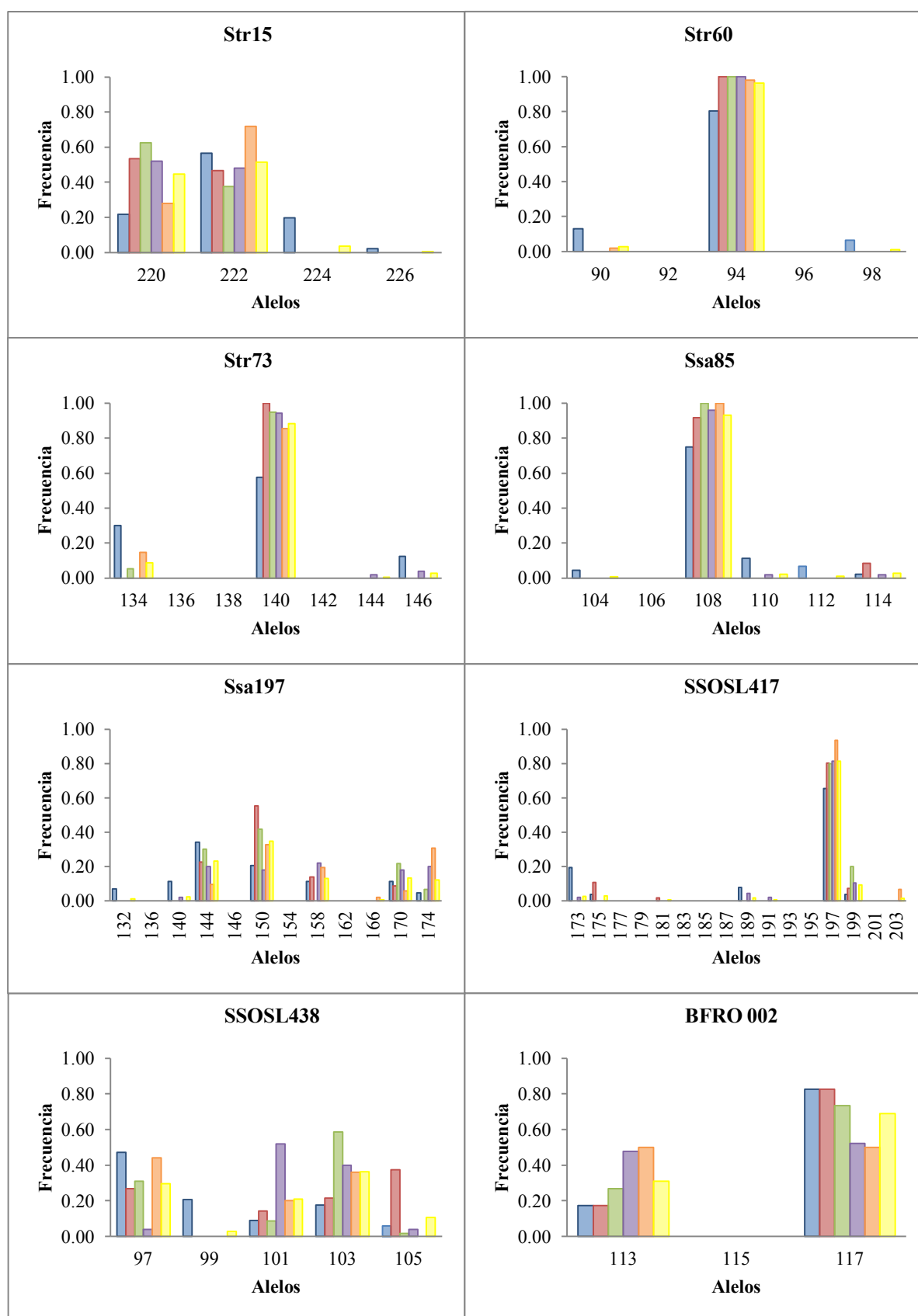


Figura IV.4. Frecuencias alélicas obtenidas para los ocho loci microsatélites analizados en los ríos Guadalquivir I (■), Borosa (■), Aguasmulas (■), Guadalquivir II (■) y Aguascebas (■); así como en toda la cuenca del Alto Guadalquivir (■).

IV.3.1.1.2. Diversidad genética intrapoblacional en la cuenca del Guadiana Menor

En la cuenca del Guadiana Menor se detectó para la región control un único haplotipo nativo perteneciente a la línea evolutiva *Adriática-Suribérica*, mostrando una composición haplotípica nativa homogénea constituida por el haplotipo **AD_{SI}1** (Figura IV.2).

Por otro lado, el análisis de los ocho microsatélites estudiados permitió identificar 52 variantes alélicas en la cuenca, 12 de los cuales correspondientes a stocks de piscifactoría (Anexo III). Las formas alélicas de origen exótico mostraron una elevada incidencia a nivel de cuenca, presentando los alelos foráneos Str15*224, Ssa85*110 y Ssa197*140 unas frecuencias elevadas. Sin embargo, los ríos presentaron una incidencia baja de alelos exóticos, con la excepción de Guardal, Alhorí y Fardes que mostraron frecuencias superiores al 5% para los microsatélites Str15*224, Str60*98, Ssa85*110 y 114, Ssa197*140, SSOSL417*189 y SSOSL438*99 (Figura IV.5). La alta diversidad global encontrada en la cuenca del Guadiana Menor (Tabla IV.1), no fue observada a nivel de río (Tabla IV.3), mostrando el arroyo del Pueblo unos niveles ligeramente inferiores al resto de cursos fluviales, posiblemente generado por el bajo número de ejemplares analizados. El número de desviaciones del equilibrio H-W no fue muy elevado, encontraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas para nueve de los 48 loci. Los valores de F_{IS} fueron positivos para los ríos Castril, Guadalentín y Alhorí, y arroyo del Pueblo, mostrando valores significativos al ser agrupados los loci analizados en los ríos Castril y Alhorí.

Por otro lado, las frecuencias alélicas, excluyendo las variantes alóctonas y aquellos alelos con frecuencias inferiores al 5%, los loci Str60, Str73 y Ssa85 exhibieron en el Guadiana Menor una distribución unimodal, los microsatélites Str15, SSOSL417 y BFRO 002 un patrón bimodal, mientras que los loci Ssa197 y SSOSL438 mostraron una distribución de frecuencias multimodal (Figura IV.5). Los ríos exhibieron un patrón similar al descrito para la cuenca del Guadiana Menor, salvo excepciones. De hecho, el 44% de los loci no mostraron el patrón de distribución de frecuencias alélicas descrito globalmente (Figura IV.5). Al comparar sus ríos, se detectaron diferencias en las variantes alélicas más frecuentes en seis loci. Excluyendo las variantes foráneas, el alelo Str15*218 mostró una mayor frecuencia en los ríos Guardal, Alhorí y Fardes, mientras que la variante *222 fue mayoritaria en el Castril, Guadalentín y arroyo del Pueblo. El locus Ssa85 permitió diferenciar el río Fardes del resto de cursos en la cuenca, mientras que el microsatélite Ssa197 mostró unas mayores frecuencias del alelo nativo *144 en el arroyo del Pueblo y los ríos Alhorí y Fardes. En relación al locus SSOSL417, el alelo *195 mostró una mayor frecuencia en los ríos Alhorí y Fardes, la variante *197 en el Guadalentín y arroyo del Pueblo, mientras que la forma alélica *199 fue mayoritaria en los cursos del Guardal y Castril. Finalmente, el locus SSOSL438 permitió agrupar a los ríos Alhorí y Fardes, mientras que el microsatélite BFRO 002 mostró unas frecuencias elevadas del alelo *113 en el Castril y Alhorí. Las diferencias entre las distintas formas alélicas mayoritarias fueron debidas a entre uno y tres saltos mutacionales entre ellas. Cabe destacar que en la cuenca del Guadiana Menor se detectaron dos variantes alélicas exclusivas de río. El alelo Str60*96 presentó una distribución restringida al río Guardal, mientras que la forma alélica Str73*136 fue encontrada únicamente el curso del Castril. Finalmente, el Guadiana Menor presentó cinco alelos

exclusivos dentro de la propia cuenca del Guadalquivir y compartidos con las cuencas del Guadalfeo y Segura (Capítulos IV.3.2 y IV.3.3). Las variantes alélicas Str15*218, Str73*142 y SSOSL417*171 permitieron distinguir la cuenca del Guadiana Menor del resto de cuencas pertenecientes al Guadalquivir, mientras que los alelos Str73*132 y SSOSL438*93, presentaron una distribución restringida dentro del Guadiana Menor a los ríos Castril y Guardal, respectivamente.

Tabla IV.3. Parámetros de diversidad genética poblacional estimados para la Trucha Común en los ríos analizados de la cuenca del Guadiana Menor. Parámetros estimados: número de ejemplares analizados (N), número de alelos (A), riqueza alélica (A_R), alelos privados (P_A), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e) e índice de fijación (F_{IS}). Las desviaciones significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas bajo el equilibrio de H-W son indicadas por medio de asteriscos (Valores de significación: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

		Str15	Str60	Str73	Ssa85	Ssa197	SSOSL417	SSOSL438	BFRO 002	Total
Guardal	N	25	25	25	25	25	25	24	25	19
	A	4	3	4	4	6	8	5	2	4,500
	A_R	1,554	1,427	1,350	1,518	1,717	1,789	1,453	1,301	1,514
	P_A	0,015	0,796	0,121	0,067	0,075	0,977	0,174	0,000	0,280
	H_o	0,680	0,440	0,400	0,560	0,680	0,800	0,333	0,280	0,522
	H_e	0,543	0,418	0,343	0,508	0,702	0,774	0,444	0,295	0,503
	F_{IS}	-0,233	-0,031	-0,146	-0,082	0,052	-0,014	0,268	0,072	-0,016
Castril	N	57	59	55	60	58	47	52	54	60
	A	3	3	6	2	3	4	3	2	3,250
	A_R	2,287	2,347	4,622	1,563	2,155	3,366	2,864	1,307	2,564
	P_A	0,000	0,012	1,349	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,170
	H_o	0,368	0,136	0,346	0,083	0,535	0,404	0,519	0,037	0,304
	H_e	0,388	0,289	0,652	0,080	0,481	0,593	0,582	0,036	0,388
	F_{IS}	0,058**	0,537***	0,729***	-0,035	-0,102	0,328**	0,118*	-0,010	0,052***
Guadalentín	N	55	58	56	59	59	59	55	57	59
	A	3	2	3	1	4	2	4	2	2,625
	A_R	2,164	1,287	1,709	1,000	3,915	1,570	3,191	1,584	2,053
	P_A	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	H_o	0,546	0,035	0,018	0,000	0,627	0,085	0,564	0,088	0,245
	H_e	0,500	0,034	0,086	0,000	0,688	0,081	0,577	0,084	0,256
	F_{IS}	-0,083	-0,009	0,845***	-	0,097	-0,036	0,032	-0,034	0,088
Arroyo del Pueblo	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	A	2	1	1	1	3	2	1	2	1,625
	A_R	1,209	1,000	1,000	1,000	1,699	1,366	1,000	1,111	1,173
	P_A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	H_o	0,222	0,000	0,000	0,000	0,222	0,444	0,000	0,111	0,125
	H_e	0,198	0,000	0,000	0,000	0,661	0,346	0,000	0,105	0,164
	F_{IS}	-0,067	-	-	-	0,695**	-0,231	-	0,000	0,291
Alhorí	N	35	35	34	34	34	35	35	35	35
	A	5	3	3	4	5	4	3	2	3,625
	A_R	3,888	2,382	2,714	3,162	2,601	3,213	2,577	1,999	2,817
	P_A	0,332	0,041	0,229	0,142	0,276	0,289	0,017	0,000	0,170
	H_o	0,571	0,229	0,441	0,412	0,206	0,600	0,314	0,371	0,393
	H_e	0,665	0,209	0,443	0,589	0,192	0,550	0,351	0,396	0,424
	F_{IS}	0,155	-0,082	0,184	0,315	-0,057	-0,077	0,120	0,075	0,082*
Fardes	N	55	57	55	57	56	56	52	55	58
	A	4	1	1	3	7	4	4	2	3,250
	A_R	3,511	1,000	1,000	2,292	4,794	2,921	3,611	1,999	2,641
	P_A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	0,439	0,000	0,060
	H_o	0,746	0,000	0,000	0,544	0,679	0,714	0,615	0,236	0,442
	H_e	0,671	0,000	0,000	0,510	0,729	0,550	0,631	0,405	0,437
	F_{IS}	-0,101	-	-	-0,059	0,078*	-0,291**	0,034	0,424**	-0,002

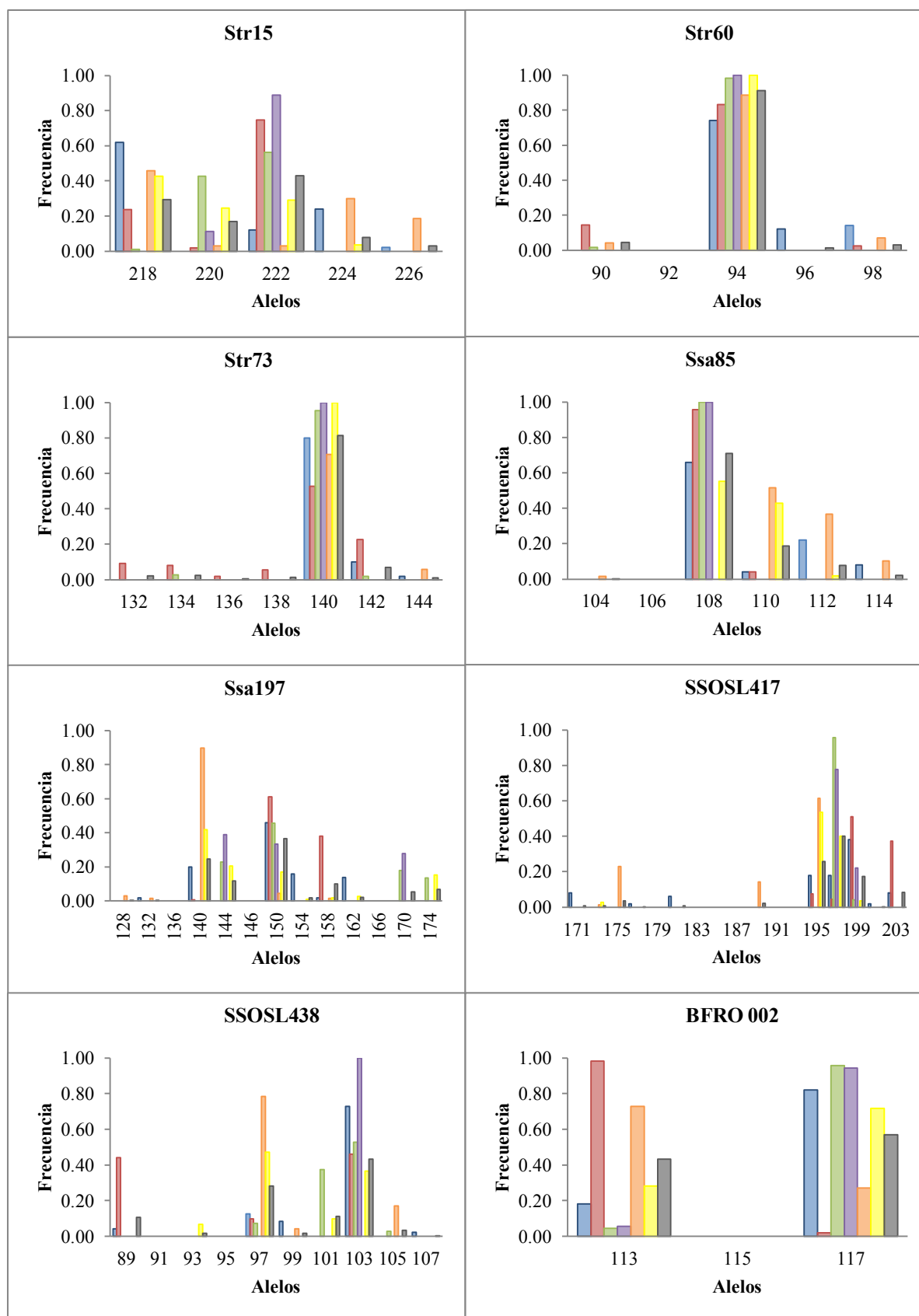


Figura IV.5. Frecuencias alélicas obtenidas para los ocho loci microsatélites analizados en los ríos Guardal ■, Castril ■, Guadalentín ■, arroyo del Pueblo ■, Alhorí ■ y Fardes ■; así como en toda la cuenca del Guadiana Menor ■.

IV.3.1.1.3. Diversidad genética intrapoblacional en la cuenca del Genil

En la cuenca del Genil se detectaron para la región control tres haplotipos nativos pertenecientes a la línea evolutiva *Adriática-Suribérica* (**AD_{SI}1**, **AD_{SI}4** y **AD_{SI}5**). La distribución geográfica y las frecuencias de cada haplotipo nativo encontrado son mostradas en la Figura IV.2. Excluyendo los haplotipos exóticos, un 12% de los ejemplares fueron clasificados dentro del haplotipo **AD_{SI}1**, un 45% a la secuencia **AD_{SI}4** mientras que el 43% restante fue designado como **AD_{SI}5**. Los valores de diversidad haplotípica globales fueron elevados ($H = 0,601 \pm 0,022$), mientras que los niveles de diversidad nucleotídica fueron bajos ($\pi_n = 0,001 \pm 0,001$). Estos valores contrarrestan con la homogeneidad haplotípica observada dentro de sus ríos (Figura IV.2).

Por otro lado, el análisis de los loci microsatélites permitió identificar 55 variantes alélicas en la cuenca, 12 de las cuales eran de origen alóctono (Anexo III). Estos alelos exóticos mostraron una baja incidencia en los ríos de la cuenca del Genil, con la excepción del Genil y Alhama, donde se encontraron algunos alelos foráneos con frecuencias alélicas superiores al 5% (Figura IV.6). Los ríos mostraron una diversidad genética inferior a la encontrada globalmente en la cuenca del Genil (Tabla IV.4). Los valores de variabilidad genética variaron dependiendo del río analizado, mostrando el río Cacán unos niveles ligeramente superiores al resto de cursos fluviales (Tabla IV.4). Por otro lado, se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas en 15 de los 56 loci. Al ser estudiados de manera global por río, los valores de F_{IS} fueron positivos y significativos en los ríos Genil, Maitena, Aguas Blancas y Cacán, mientras que el Monachil, Dílar y Alhama no mostraron diferencias significativas con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg.

En relación a las frecuencias alélicas, excluyendo las variantes alóctonas y aquellos alelos con frecuencias inferiores al 5%, los loci Str15 y Ssa85 exhibieron en la cuenca una distribución unimodal, los microsatélites Str60, Str73 y SSOSL438 un patrón bimodal, mientras que los loci Ssa197, SSOSL417 y BFRO 002 mostraron una distribución de frecuencias multimodal (Figura IV.6). Al ser analizado cada río por separado, el 57% de los loci no mostraron el patrón de distribución de frecuencias alélicas descrito para toda la cuenca. Además de mostrar patrones de distribución distintos, se detectaron diferencias en las variantes alélicas más frecuentes en cinco de los loci analizados (Figura IV.6). De esta manera, el alelo Str15*220 mostró una mayor frecuencia en los ríos Genil, Maitena y Aguas Blancas; mientras que la variante *222 fue mayoritaria en el resto de ríos de la cuenca. El locus Ssa197 permitió diferenciar los ríos Monachil y Cacán del resto de cursos fluviales, mostrando unas mayores frecuencias de los alelos *144 y *154, respectivamente. En relación al locus SSOSL417, cada río mostró una variante mayoritaria, con la excepción del Genil, Aguas Blancas y Dílar, que presentaron en alta frecuencia la variante *201. El microsatélite SSOSL438 permitió diferenciar a los ríos Aguas Blancas, Dílar y Cacán (*97) de los cursos del Genil y Maitena (*113). Finalmente, el locus BFRO 002 mostró la variante *117 en alta frecuencia en el Monachil, separando este río del resto de cursos de la cuenca. Las diferencias entre las distintas formas alélicas mayoritarias fueron debidas a entre uno y cuatro saltos mutacionales entre ellas. En la cuenca del Genil se detectaron cinco variantes alélicas exclusivas cuenca o río. La variante

BFRO 002*109 presentó una distribución restringida a la cuenca del Genil, siendo detectada en los ríos Genil, Maitena y Cacán. Los alelos Str15*200, Str73*156 y Ssa197*146 fueron detectados únicamente en el Cacán, mientras que la forma alélica Str85*118 se asignó de manera exclusiva al río Genil. Por otro lado, el Genil presentó siete alelos exclusivos dentro de la propia cuenca del Guadalquivir y compartidos con las cuencas del Guadalfeo y Segura (Capítulos IV.3.2 y IV.3.3). Las variantes alélicas SSOSL417*205, *209, *211, SSOSL438*111 y *113 permitieron distinguir la cuenca del Genil del Alto Guadalquivir y Guadiana Menor, mientras que los alelos Str15*212 y SSOSL417*207, presentaron una distribución restringida a al río Maitena.

IV. Diversidad y estructuración genética en el sur de la Península Ibérica

Tabla IV.4. Parámetros de diversidad genética poblacional estimados para la Trucha Común en los ríos analizados de la cuenca del Genil. Parámetros estimados: número de ejemplares analizados (N), número de alelos (A), riqueza alélica (A_R), alelos privados (P_A), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e) e índice de fijación (F_{IS}). Las desviaciones significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas bajo el equilibrio de H-W son indicadas por medio de asteriscos (Valores de significación: $*$ = $p < 0,05$, $**$ = $p < 0,01$, $***$ = $p < 0,001$).

		<i>Str15</i>	<i>Str60</i>	<i>Str73</i>	<i>Ssa85</i>	<i>Ssa197</i>	<i>SSOSL417</i>	<i>SSOSL438</i>	<i>BFRO 002</i>	Total
Genil	N	56	55	56	55	55	54	55	55	56
	A	3	2	3	4	4	7	4	3	3,750
	A_R	2,980	1,989	2,371	3,100	3,266	3,864	3,266	2,864	2,963
	P_A	0,000	0,000	0,049	0,290	0,262	0,341	0,003	0,002	0,120
	H_o	0,536	0,164	0,089	0,164	0,236	0,130	0,127	0,164	0,201
	H_e	0,554	0,150	0,086	0,154	0,216	0,174	0,216	0,185	0,217
	F_{IS}	0,041	-0,080	-0,014	-0,052	-0,084	0,264*	0,419***	0,124	0,082*
Maitena	N	62	63	64	63	63	49	54	63	65
	A	2	3	2	2	2	3	4	2	2,500
	A_R	1,814	2,707	2,000	1,874	1,999	2,969	3,165	1,557	2,261
	P_A	0,228	0,013	0,000	0,130	0,000	2,165	0,240	0,001	0,350
	H_o	0,065	0,318	0,141	0,079	0,175	0,184	0,204	0,032	0,150
	H_e	0,062	0,398	0,351	0,076	0,233	0,530	0,460	0,031	0,268
	F_{IS}	-0,025	0,210**	0,611***	-0,033	0,260	0,660***	0,563***	-0,008	0,449***
Aguas Blancas	N	28	29	29	29	27	27	28	28	29
	A	2	2	2	1	4	3	5	1	2,500
	A_R	1,499	1,131	1,390	1,000	1,494	1,526	1,669	1,000	1,339
	P_A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,097	0,004	0,015	0,000	0,010
	H_o	0,571	0,138	0,172	0,000	0,556	0,482	0,429	0,000	0,293
	H_e	0,490	0,128	0,384	0,000	0,485	0,517	0,658	0,000	0,333
	F_{IS}	-0,149	-0,057	0,578**	-	-0,127	0,086	0,364***	-	0,136*
Monachil	N	29	30	30	30	30	30	26	30	30
	A	2	1	1	2	3	1	4	1	1,875
	A_R	1,131	1,000	1,000	1,183	1,382	1,000	1,687	1,000	1,173
	P_A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	H_o	0,069	0,000	0,000	0,133	0,467	0,000	0,731	0,000	0,175
	H_e	0,128	0,000	0,000	0,180	0,376	0,000	0,674	0,000	0,170
	F_{IS}	0,477	-	-	0,275	-0,225	-	-0,065	-	-0,012
Dílar	N	30	30	30	30	30	30	30	29	30
	A	1	2	1	1	1	1	2	1	1,250
	A_R	1,000	1,066	1,000	1,000	1,000	1,000	1,127	1,000	1,024
	P_A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
	H_o	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,133	0,000	0,025
	H_e	0,000	0,064	0,000	0,000	0,000	0,000	0,124	0,000	0,024
	F_{IS}	-	-0,018	-	-	-	-	-0,055	-	-0,042
Cacín	N	211	213	212	215	213	208	209	214	216
	A	6	3	5	4	8	7	5	3	5,125
	A_R	3,234	2,517	2,595	2,526	5,281	4,777	3,904	2,715	3,444
	P_A	0,238	0,007	0,079	0,061	0,255	0,006	0,002	0,592	0,160
	H_o	0,133	0,291	0,052	0,098	0,587	0,601	0,254	0,407	0,303
	H_e	0,149	0,260	0,121	0,095	0,577	0,632	0,301	0,525	0,332
	F_{IS}	0,109**	-0,118*	0,431***	-0,032	-0,015**	0,051**	0,16**	0,228***	0,091***
Alhama	N	25	25	23	24	25	22	21	21	25
	A	4	1	3	3	4	6	1	2	3,000
	A_R	1,592	1,000	1,237	1,550	1,480	1,663	1,000	1,285	1,351
	P_A	0,049	0,000	0,069	0,000	0,000	1,021	0,003	0,000	0,140
	H_o	0,480	0,000	0,261	0,500	0,520	0,682	0,000	0,333	0,347
	H_e	0,580	0,000	0,232	0,538	0,470	0,648	0,000	0,278	0,343
	F_{IS}	0,192	-	-0,054	0,092	-0,085	-0,029	-	-0,176	0,011

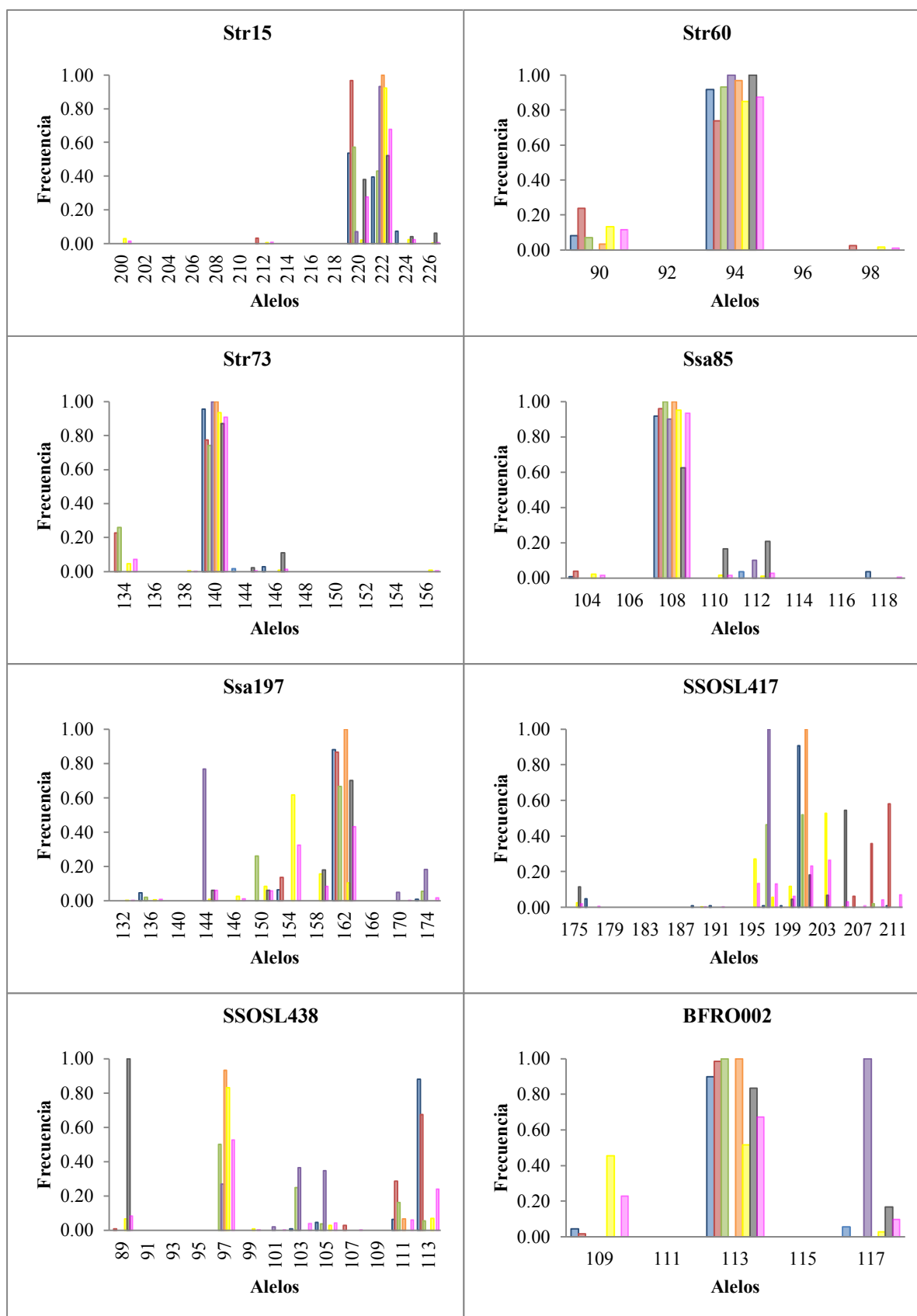


Figura IV.6. Frecuencias alélicas obtenidas para los ocho loci microsatélites analizados en los ríos Genil ■, Maitena ■, Aguas Blancas ■, Monachil ■, Dílar ■, Cacin ■ y Alhama ■ así como en toda la cuenca del Genil ■

IV.3.1.2. Diferenciación genética interpoblacional

IV.3.1.2.1. Diferenciación genética interpoblacional mitocondrial

Los niveles de diferenciación genética dentro de la cuenca del Guadalquivir fueron muy elevados ($F_{ST} = 0,464$, $p < 0,001$). Los valores de divergencia genética observados entre la cuenca del Genil y el resto de las cuencas fueron igualmente muy elevados ($F_{ST} = 0,705$, $p < 0,001$). Sin embargo, las cuencas del Alto Guadalquivir y Guadiana Menor no mostraron diferencias genéticas entre ellas al mostrar un único haplotipo nativo compartido. Los altos valores de F_{ST} encontrados al comparar por pares los ríos (Anexo IV) indicaron la existencia de una estructura poblacional alta y significativa dentro de la cuenca del Guadalquivir, poniendo de manifiesto la ausencia de flujo génico entre algunos de sus cursos fluviales.

Los resultados del análisis de AMOVA mostraron que el 63,5% de la variación genética en la cuenca del Guadalquivir fue debida a las diferencias entre sus cuencas, mientras que el 36,5 % restante pudo explicarse por las divergencias existentes entre sus ríos. Por tanto, el alto nivel de estructuración detectado ($\Phi_{ST} = 1$, $p < 0,001$) estaría relacionado tanto con los patrones hidrológicos entre ríos ($\Phi_{SC} = 1$, $p < 0,001$), como con la variación existente entre las cuencas analizadas ($\Phi_{CT} = 0,625$, $p < 0,01$). Sin embargo, las cuencas del Alto Guadalquivir y Guadiana Menor presentaron una composición haplotípica nativa homogénea, por lo que la variación encontrada se debió a la estructuración existente dentro de la cuenca del Genil ($\Phi_{ST} = 1$, $p < 0,001$), donde el 100% de las diferencias genéticas encontradas fueron debidas a la variación existente entre sus ríos ($\Phi_{CT} = 1$, $p < 0,001$).

La estructuración encontrada entre los ríos ha sido resumida en un fenograma, construido a partir de la matriz de divergencias nucleotídicas y el método de agrupamiento de distancias NJ (Figura IV.7). Las agrupaciones observadas en dicho árbol fueron apoyadas por los altos valores de F_{ST} (Anexo IV). El fenograma muestra un primer conjunto de ríos agrupados por el haplotipo nativo **AD_{SI}1**, incluyendo a las cuencas del Alto Guadalquivir, Guadiana Menor y a los ríos Monachil y Alhama del Genil. Próximo a este grupo se incluyen los ríos Dilar y Cacín, que presentaron el haplotipo **AD_{SI}5** distribuido homogéneamente. El tercer y último grupo lo formarían los ríos Genil, Maitena y Aguas Blancas, que mostraron de forma exclusiva el haplotipo **AD_{SI}4**. Este último grupo presentó una mayor proximidad genética a los cursos del Dilar y Cacín que al resto de ríos analizados en la cuenca del Genil.

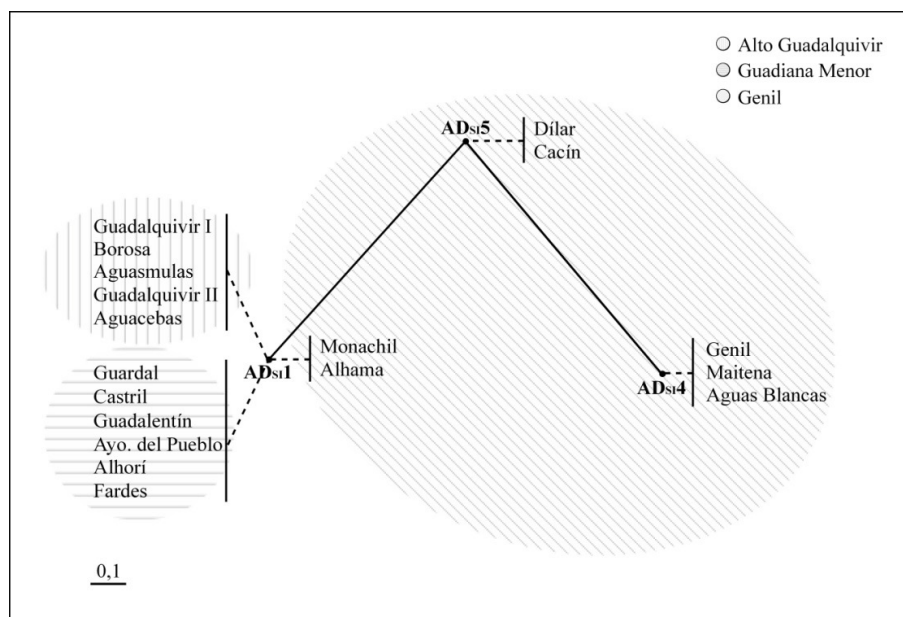


Figura IV.7. Fenograma basado en la matriz de distancias genéticas y el análisis de *NJ* para la región D-Loop entre los ríos analizados en la cuenca del Guadalquivir.

Los resultados de los análisis de PCA (Figura IV.8) fueron concordantes con el fenograma obtenido previamente. En el análisis de PCA la primera coordenada explicó un elevado porcentaje de la varianza, tanto a nivel de río (87%) como de localidad (67%). Este eje distribuyó a estas poblaciones según la frecuencia de los haplotipos AD_{S1} y AD_{S4} , separando, las cuencas del Genil del resto. La segunda coordenada del análisis permitió diferenciar a nivel de río la peculiaridad existente dentro de la cuenca del Genil, separando el Cacín y el Dílar (AD_{S5}) del resto de poblaciones comparadas.

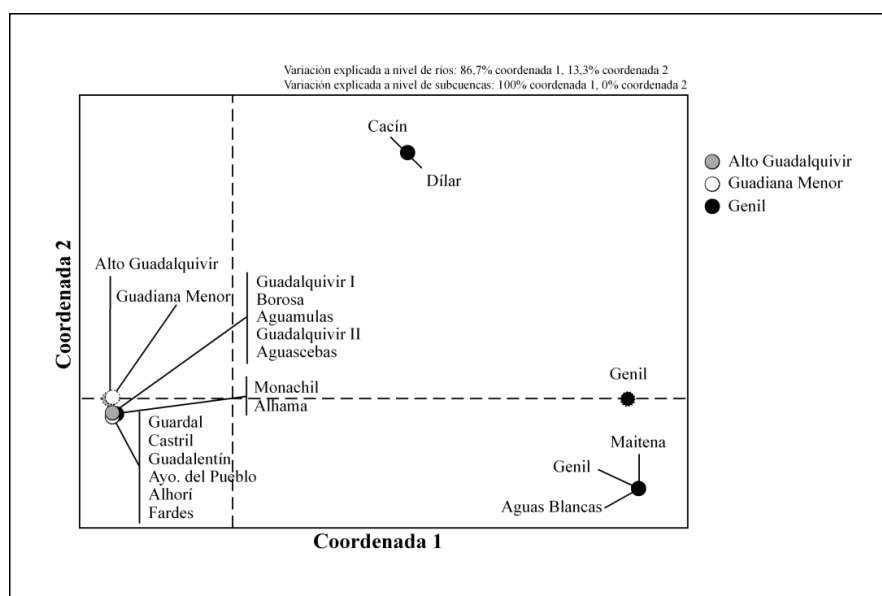


Figura IV.8. PCA basado en la matriz de distancias genéticas F_{ST} entre los ríos (círculos punteados) y localidades analizadas en la cuenca del Guadalquivir.

IV.3.1.2.2. Diferenciación genética interpoblacional nuclear

Los valores de diferenciación genética entre las cuencas analizadas fueron elevados ($R_{ST} = 0,264$). Las divergencias entre el Alto Guadalquivir y el Guadiana Menor ($R_{ST} = 0,071$, $p < 0,001$) y entre el Alto Guadalquivir y Genil ($R_{ST} = 0,071$, $p < 0,001$) fueron moderadas, observándose la mayor diferenciación genética obtenida entre las cuencas del Guadiana Menor y Genil ($R_{ST} = 0,244$, $p < 0,001$). El alto nivel de estructuración detectado en el análisis de AMOVA ($\Phi_{ST} = 0,335$, $p < 0,001$) se relacionó con la variación existente tanto entre ríos ($\Phi_{SC} = 0,249$, $p < 0,001$) como entre cuencas ($\Phi_{CT} = 0,116$, $p < 0,05$), siendo en menor medida generada por la divergencia presente dentro de cada río ($\Phi_{CT} = 0,051$, $p < 0,001$). El 11,5% de la variación encontrada fue debida a las diferencias entre las cuencas estudiadas, mientras que el 22% y el 4% de la variación serían explicados por las divergencias existentes entre y dentro de sus ríos, respectivamente.

Los resultados obtenidos empleando el programa *STRUCTURE* mostraron una estructuración genética constituida por cinco poblaciones parentales ($K=5$), observándose una clara dominancia de uno o varios grupos dependiendo de la cuenca o río analizado (Figura IV.9). El grupo 1 sería característico de la cuenca del Alto Guadalquivir, y los ríos Guadalentín, arroyo del Pueblo y Monachil. El grupo 3 incluiría los ríos Guardal, Alhorí y Fardes del Guadiana Menor, relacionando las cuencas del Alto Guadalquivir y Guadiana Menor debido a la alta proporción de este grupo en el río Guadalquivir I. El grupo 4 relacionaría las cuencas del Guadiana Menor y Genil, siendo los ríos Castrol y Alhama asignados a esta población parental. Finalmente, los grupos 2 y 5 serían específicos de la cuenca del Genil. El grupo 2 agruparía los ríos Genil, Maitena y Aguas Blancas, mientras que el río Cacán presentó un grupo altamente diferenciado.

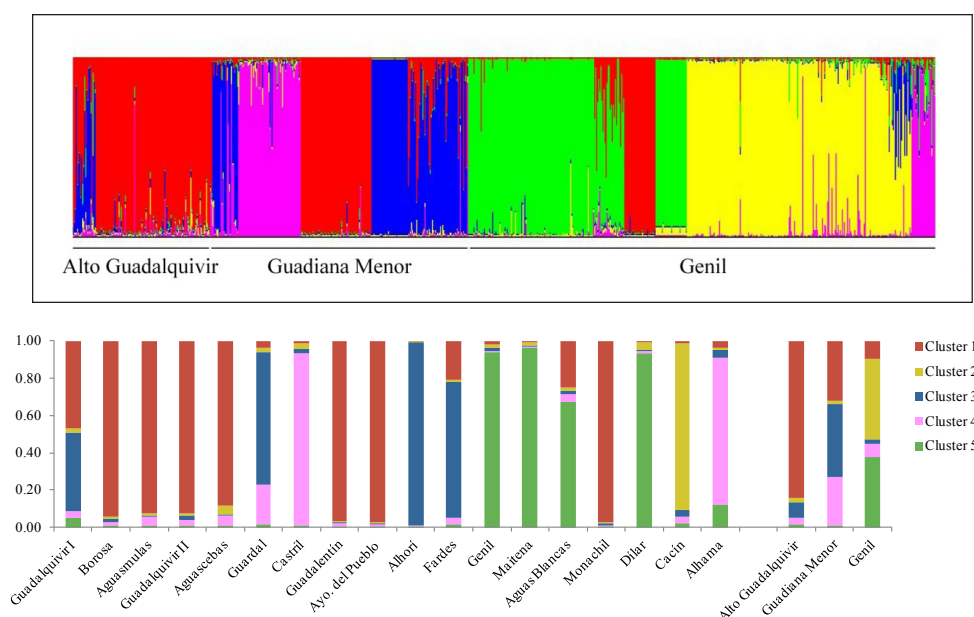


Figura IV.9. Estructura genética estimada para $K=5$ obtenida por el programa *STRUCTURE* y validada por el test de Evanno para los ejemplares analizados en la cuenca del Guadalquivir. La proporción media de cada grupo parental es indicada empleando un histograma de frecuencias.

La estructuración entre los ríos ha sido resumida en dos fenogramas, generados a partir de las matrices de distancias genéticas D_A y D_C y el método de agrupamiento NJ (Figura IV.10). Ambas reconstrucciones mostraron topologías similares, obteniéndose un mayor soporte y longitud de ramas a partir de la matriz de distancias de Cavalli-Sforza. Los resultados obtenidos revelaron una moderada diferenciación genética entre las cuencas analizadas. Aunque son observados algunos patrones regionales, algunos ríos con distinto origen hidrográfico mostraron una mayor proximidad genética entre sí que con otros cursos más próximos geográficamente. De esta manera, todos los ríos de la cuenca Alto Guadalquivir, junto con los cursos del Guadalentín, arroyo del Pueblo y río Monachil constituyeron un primer grupo diferenciado y apoyado por unos valores de *bootstrap* elevados. Un segundo grupo mostró una mayor proximidad de los ríos Guardal, Fardes y Alhorí pertenecientes a la cuenca del Guadiana Menor. Finalmente, se observó un tercer grupo formado por el río Castril y todos los cursos de la cuenca del Genil, con la excepción del río Monachil. Al analizar cada ejemplar por separado, el fenograma de NJ mostró una topología típica de árbol, exhibiendo numerosas ramificaciones a lo largo de toda su estructura (Figura IV.10). Dentro de la cuenca del Guadalquivir los ríos presentaron un nivel de mezcla moderado, existiendo algunos nodos con ejemplares de distinta procedencia geográfica. La topología obtenida pone de manifiesto la presencia de una elevada estructuración a nivel de río pero moderada a nivel de cuenca hidrográfica. De hecho, la ligera agrupación observada entre los ríos de la cuenca del Genil no es detectada en el Alto Guadalquivir y Guadiana Menor.

El resultado obtenido en el análisis de PCA (Figura IV.11) fue concordante con los fenogramas poblacionales obtenidos previamente. En este análisis, la primera coordenada explicó un moderado porcentaje de la varianza, tanto a nivel de río (56%) como de localidad (40,5%). Salvo algunas excepciones, este eje separó las poblaciones del Genil de las cuencas del Alto Guadalquivir y Guadiana Menor. La distribución a lo largo de este eje fue determinada principalmente por la variación alélica encontrada en los loci Str15, Str73, Ssa85, Ssa197 y BFRO 002, presentando una variabilidad superior al 50%. La segunda coordenada del análisis permitió destacar las diferencias existentes dentro de cada cuenca, no siendo posible detectar patrones a nivel global entre las tres cuencas del Guadalquivir. Las poblaciones se distribuyeron principalmente según la variabilidad de frecuencias alélicas encontradas en los loci Str60, Str73 y SSOSL438, mostrando estos microsatélites una variación superior al 30% en esta coordenada.

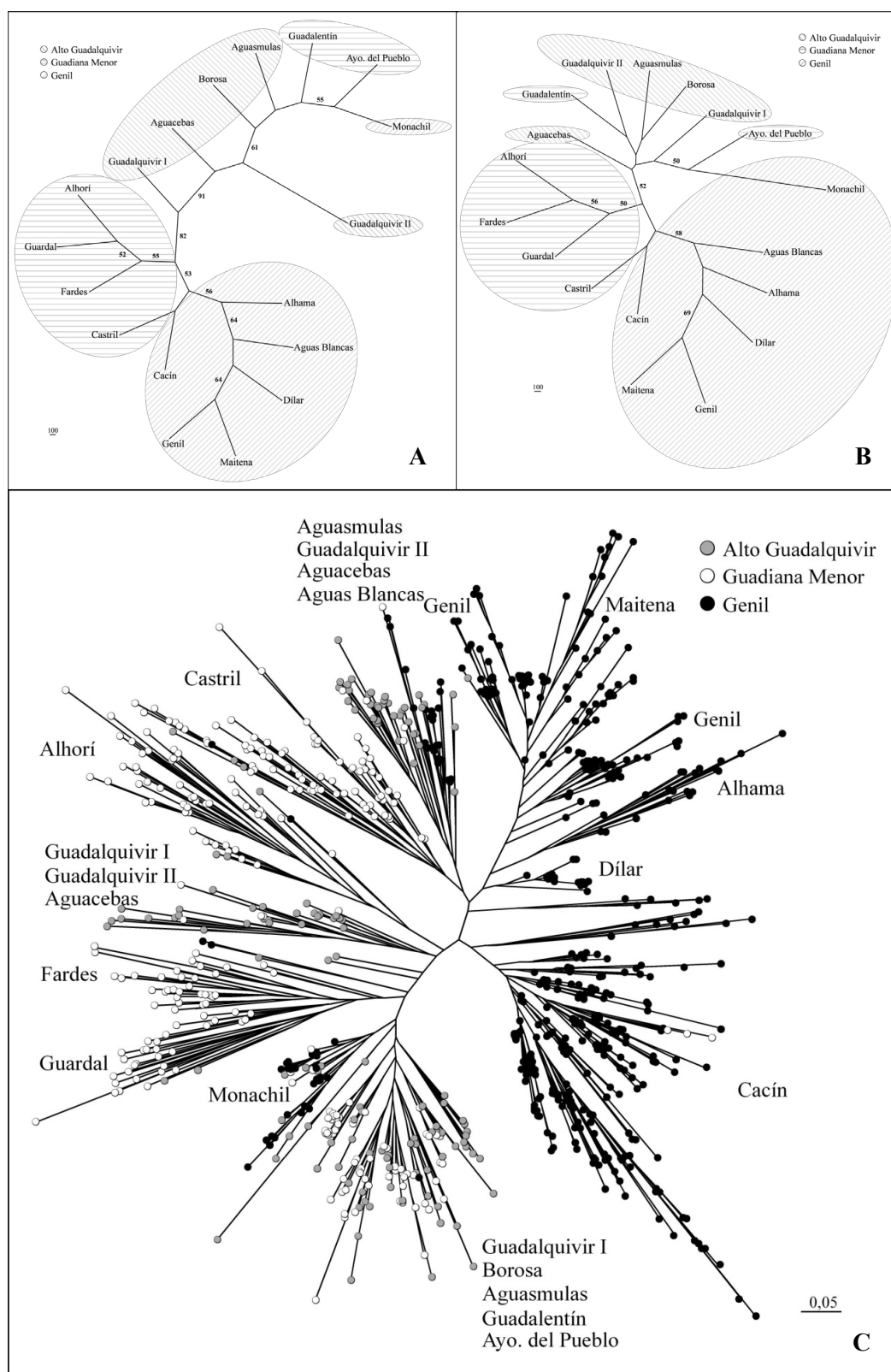


Figura IV.10. Fenogramas basados en el método de agrupamiento de *NJ* a partir de las matrices de distancias genéticas de Nei (A) y de Cavalli-Sforza (B) entre los ríos de la cuenca del Guadalquivir así como entre todos ejemplares analizados empleando la matriz de distancias genéticas de Cavalli-Sforza (C). Los valores de *bootstrap* superiores a 60 obtenidos en los árboles (A) y (B) son indicados en las ramas de cada árbol.

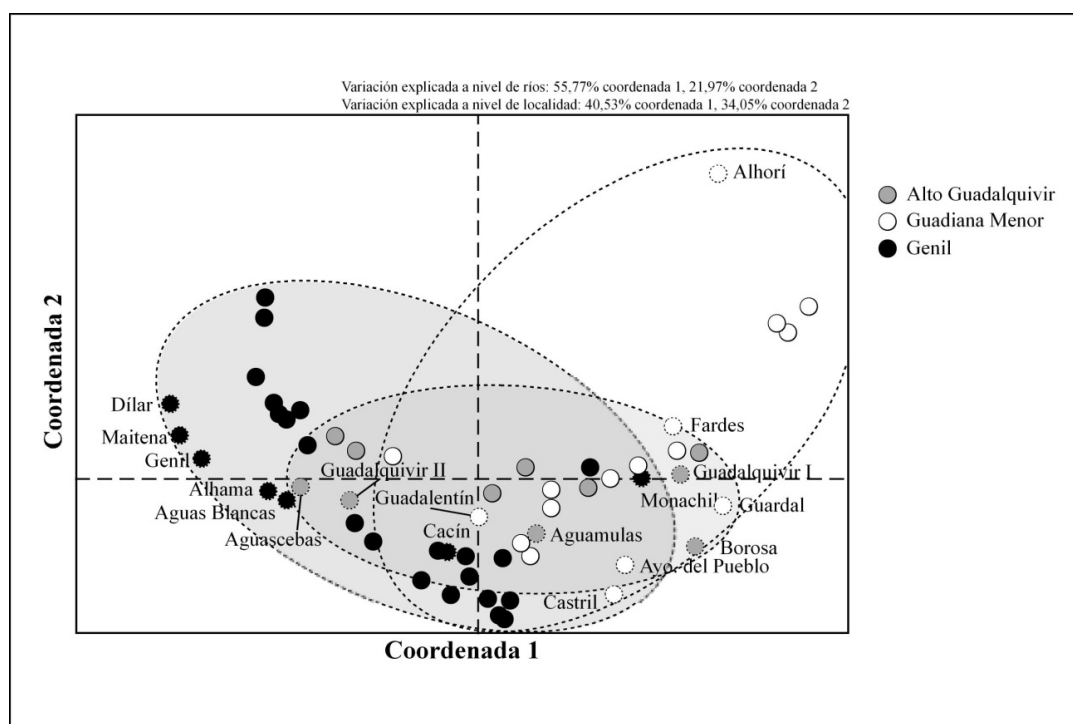


Figura IV.11. PCA basado en la matriz de distancias genéticas R_{ST} entre los ríos (círculos punteados) y localidades analizadas en la cuenca del Guadalquivir.

IV.3.1.2.2.1. Diferenciación genética interpoblacional en la cuenca del Alto Guadalquivir

Los valores de diferenciación genética dentro de la cuenca del Alto Guadalquivir fueron moderados ($R_{ST} = 0,117$). La divergencia osciló entre $-0,008$ ($p > 0,05$) en los ríos Aguascebas y Guadalquivir II y $0,260$ ($p < 0,01$) para el Aguascebas y Borosa (Anexo IV). El embalse de Tranco supone una barrera infranqueable para las truchas, impidiendo el flujo genético entre poblaciones anteriormente conectadas. Aguas arriba del embalse, los ríos mostraron una baja diferenciación genética ($R_{ST} = 0,028$), observándose una alta divergencia al ser comparados con los cursos situados aguas abajo ($R_{ST} = 0,177$, $p < 0,001$). Dentro del río Guadalquivir I los resultados obtenidos mostraron una diferenciación elevada y significativa entre sus dos localidades ($R_{ST} = 0,187$, $p < 0,001$). Siguiendo un criterio hidrográfico, el nivel de estructuración ($\Phi_{ST} = 0,143$, $p < 0,001$) se relacionó con el patrón hidrológico presente dentro de cada río ($\Phi_{SC} = 0,204$, $p < 0,05$) y no con la diferenciación existente entre los propios ríos analizados ($\Phi_{CT} = -0,078$, $p > 0,05$), explicando el 22% de la variación encontrada. Por otro lado, el elevado nivel de estructuración encontrado al agrupar las poblaciones según se situaran aguas arriba o abajo del embalse de Tranco ($\Phi_{ST} = 0,185$, $p < 0,001$) no se relacionó con patrones de estructuración generados por el propio embalse ($\Phi_{CT} = 0,156$, $p > 0,05$), siendo el 82% de la variación genética encontrada generada por diferencias entre sus ríos y localidades.

Los resultados obtenidos empleando el programa *STRUCTURE* mostraron dentro de la cuenca del Alto Guadalquivir una estructuración genética constituida por tres poblaciones parentales ($K=3$), observándose un gradiente en la proporción media de los grupos 2 y 3 desde el río Borosa hasta el Aguascebas (Figura IV.12). Según los resultados obtenidos, el grupo 1 se

encontró ampliamente representado en el Guadalquivir I, formando un grupo diferenciado dentro de la cuenca. La proporción media del grupo 2 en el río Borosa fue del 71%, disminuyendo progresivamente la presencia de este grupo parental en las poblaciones en dirección aguas abajo. Por otro lado, el grupo 3 presentó una distribución inversa al anterior, observándose en el río Aguascebas la mayor proporción media (62%), y disminuyendo este porcentaje en dirección aguas arriba en la cuenca. Por lo tanto, con las excepciones de los ríos Guadalquivir I y Borosa, el resto de cursos no pudieron ser asignados a una única poblacional parental, mostrando sus ejemplares unas proporciones de mezcla inferiores a 0,65 y similares entre los grupos 2 y 3. Para poder detectar la sub-estructuración existente dentro de cada uno de estos grupos, las tres regiones definidas fueron reanalizadas por separado con el programa *STRUCTURE*, no obteniéndose signos de sub-estructuración poblacional.

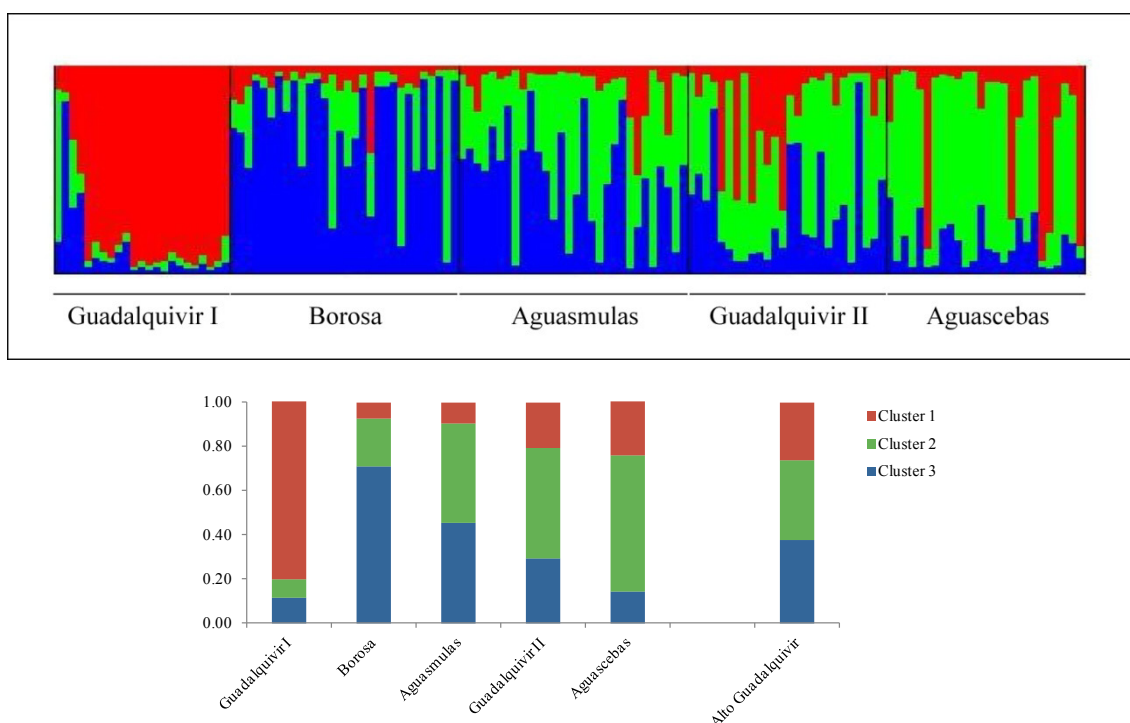


Figura IV.12. Estructura genética estimada para $K=3$ obtenida por el programa *STRUCTURE* y validada por el test de Evanno para los ejemplares analizados en la cuenca del Alto Guadalquivir. La proporción media de cada grupo parental es indicada empleando un histograma de frecuencias.

La estructuración entre los ríos del Alto Guadalquivir ha sido resumida en dos fenogramas, generados a partir de las matrices de distancias genéticas D_A y D_C y el método de agrupamiento *NJ* (Figura IV.13). Ambas reconstrucciones mostraron topologías similares, obteniéndose un mayor soporte y longitud de ramas a partir de la matriz de distancias de Cavalli-Sforza. Todos los ríos se dispusieron alrededor de un eje central con longitudes de ramas similares, con la excepción de la población del Guadalquivir I que presentó una mayor distancia genética. Los valores de *bootstrap* obtenidos fueron muy bajos, observándose una mayor proximidad a partir de la matriz D_C entre el Guadalquivir I y Aguascebas (47%), y los

ríos Borosa y Aguasmulas (58%). Al analizar cada ejemplar por separado, el fenograma de *NJ* presentó ramificaciones profundas (Figura IV.13), mostrando una estructura con forma de estrella característica de aquellas poblaciones que han sufrido recientemente un cuello de botella o un efecto fundador seguido de un crecimiento demográfico rápido. Dentro del Alto Guadalquivir los ríos presentaron un nivel de mezcla elevado, sin que se observasen signos de estructuración poblacional dentro de esta cuenca.

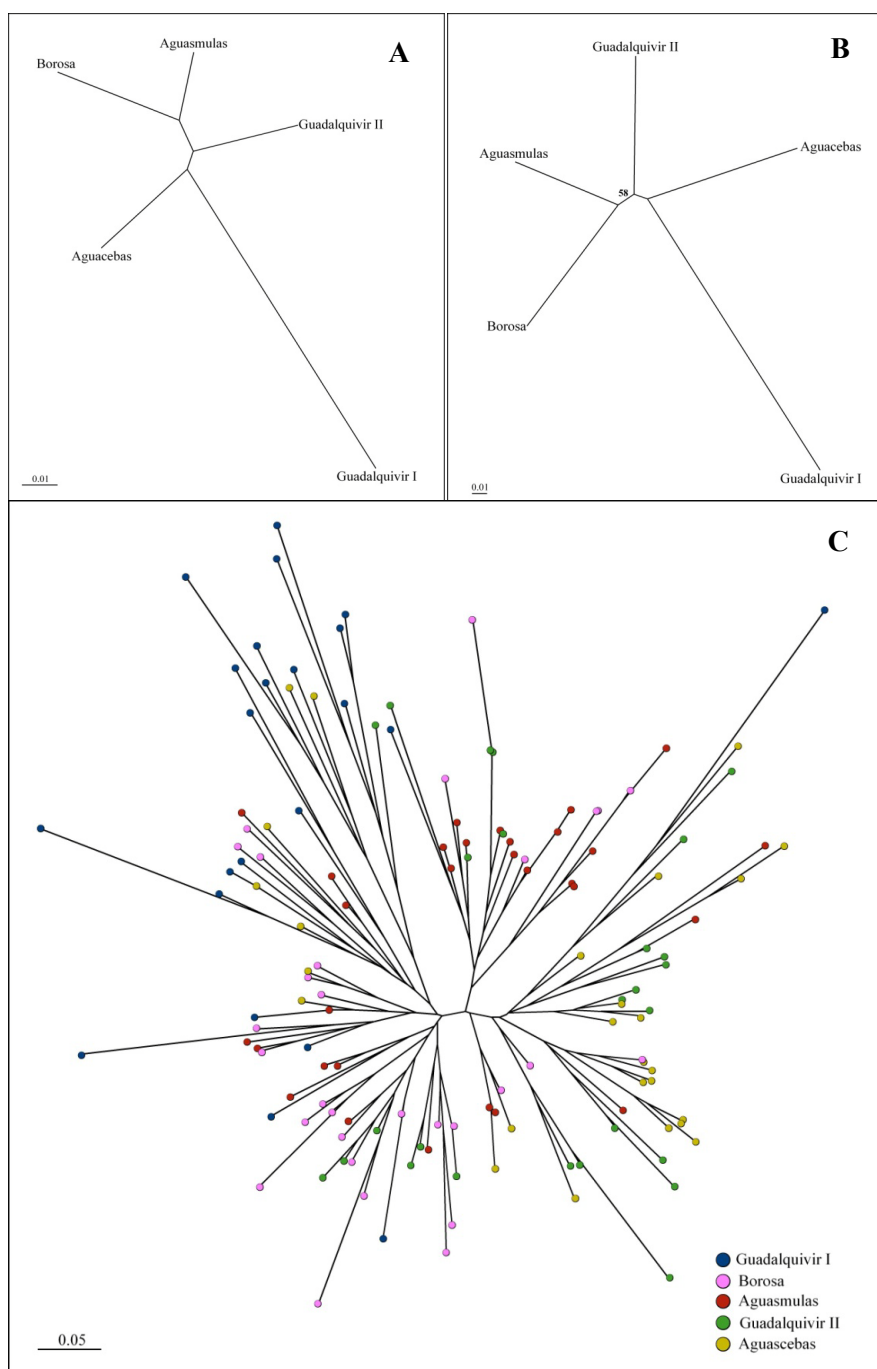


Figura IV.13. Fenogramas basados en el método de agrupamiento de *NJ* a partir de las matrices de distancias genéticas de Nei (A) y de Cavalli-Sforza (B) entre los ríos de la cuenca del Alto Guadalquivir así como entre todos ejemplares analizados empleando la matriz de distancias genéticas de Cavalli-Sforza (C).

IV.3.1.2.2.2. Diversidad genética interpoblacional en la cuenca del Guadiana Menor

Los valores de diferenciación genética dentro de la cuenca del Guadiana Menor fueron elevados ($R_{ST} = 0,236$). La divergencia encontrada osciló entre $-0,011$ ($p > 0,05$) en los ríos Guadalentín y el arroyo del Pueblo, y $0,719$ ($p < 0,001$) para los ríos Castril y Alhorí (Anexo IV). Dentro del Guadalentín los resultados obtenidos mostraron una diferenciación moderada y significativa entre sus dos localidades ($R_{ST} = 0,087$, $p < 0,050$). Por otro lado, el río Castril presentó unos valores de divergencia entre sus localidades elevados ($R_{ST} = 0,161$, $p < 0,001$), mientras que en el resto de cursos fluviales analizados no se detectaron evidencias de sub-estructuración poblacional. El elevado nivel de estructuración encontrado ($\Phi_{ST} = 0,279$, $p < 0,001$) pareció estar relacionado principalmente con la diferenciación existente entre los cursos fluviales ($\Phi_{CT} = 0,243$, $p < 0,01$), e influenciado en menor medida por patrones hidrológicos dentro de cada río ($\Phi_{SC} = 0,047$, $p < 0,01$). El 24% de la variación encontrada fue debida a las diferencias existentes entre los ríos mientras que el 4% sería explicado por la divergencia existente entre las localidades analizadas.

Los resultados obtenidos empleando el programa *STRUCTURE* mostraron dentro de la cuenca del Guadiana Menor una estructuración genética constituida por tres poblaciones parentales ($K=3$), observándose una clara dominancia de uno o varios grupos dependiendo del río analizado (Figura IV.14). Según los resultados obtenidos, el río Castril formaría un grupo altamente diferenciado en la cuenca, y definido por el grupo 1. El grupo 2 sería característico del Guadalentín y arroyo del Pueblo, mientras que los ejemplares analizados en el río Alhorí fueron asignados al grupo 3. Por otro lado, los cursos del Guardal y Fardes no pudieron ser asignados a una única población parental definida. El Guardal mostró unas proporciones intermedias entre las tres poblaciones parentales definidas en la cuenca, mientras que el río Fardes presentó unos porcentajes intermedios y similares entre los grupos 2 y 3 (Figura IV.14). Para poder detectar la sub-estructuración existente, cada río o conjunto de ríos agrupados según su población parental asignada fueron reanalizados por separado con el programa *STRUCTURE*. Los resultados obtenidos no mostraron signos de subestructuración poblacional, con la excepción del río Castril. Dentro de este río, la localidad más aguas abajo (CS2) mostró signos de mezcla de dos poblaciones parentales ($K=2$) en proporciones similares (Figura IV.14).

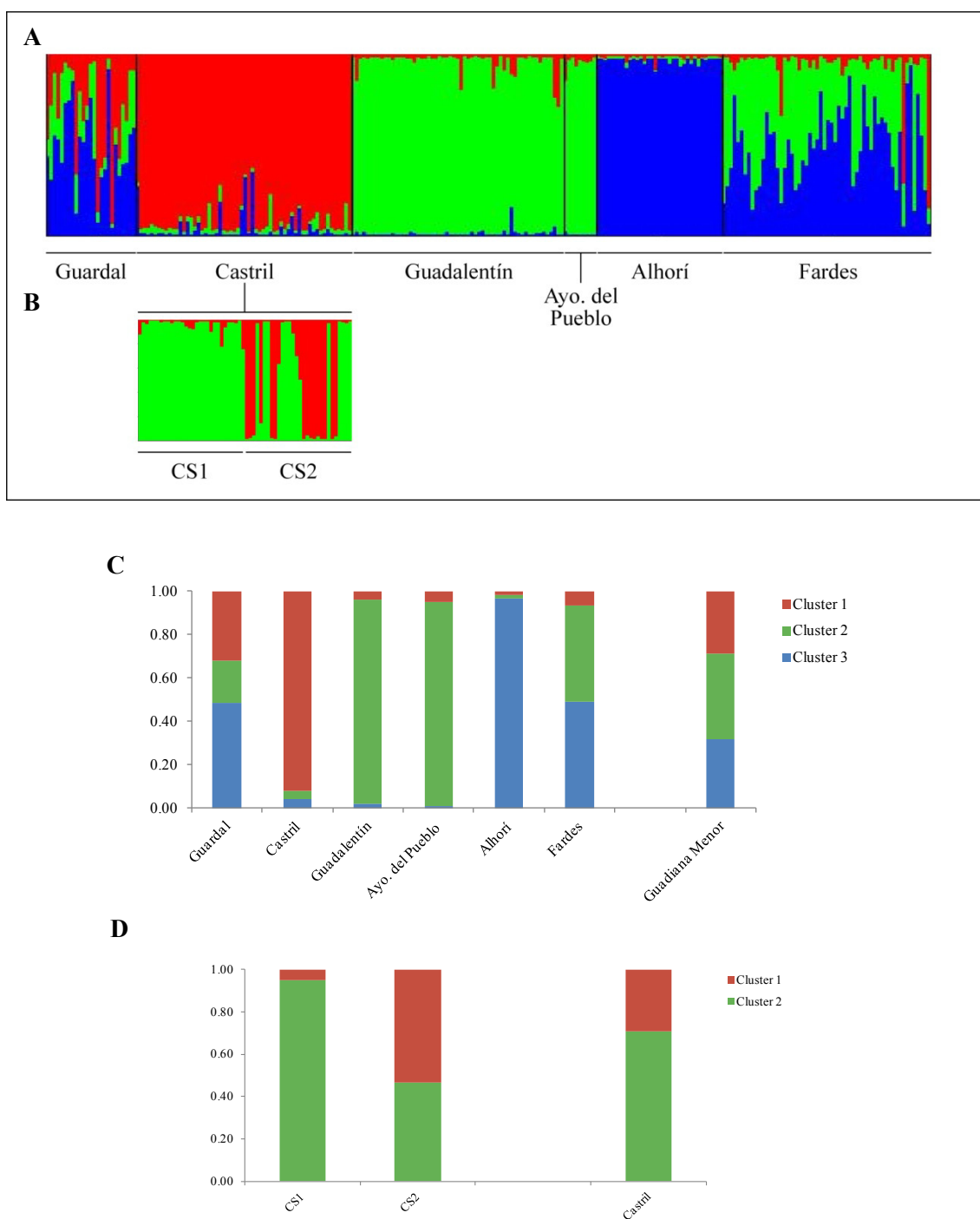


Figura IV.14. Estructura genética estimada por el programa *STRUCTURE* y validada por el test de Evanno para los ejemplares analizados en la cuenca del Guadiana Menor (**A**) y río Castril (**B**). La proporción media de cada grupo parental es indicada empleando un histograma de frecuencias (**C** y **D**).

La estructuración entre los ríos del Guadiana Menor ha sido resumida en dos fenogramas, generados a partir de las matrices de distancias genéticas D_A y D_C y el método de agrupamiento NJ (Figura IV.156). Ambas reconstrucciones mostraron topologías similares, presentando ligeras variaciones tanto en la longitud de las ramas como en los valores de soporte según la matriz empleada. El río Alhorí mostró una mayor distancia genética al ser comparado con el resto de cursos estudiados, constituyendo junto al río Fardes un grupo diferenciado y próximo al río Guardal. Los valores de *bootstrap* obtenidos entre los ríos Guadalentín y arroyo del Pueblo fueron muy elevados (Figura IV.15), formando un grupo altamente diferenciado. Finalmente, el río Castril se situó en una posición intermedia en el fenograma, disponiéndose basalmente al río Guadalentín y arroyo del Pueblo. Al analizar cada ejemplar por separado, el fenograma obtenido mostró una topología típica de árbol, exhibiendo numerosas ramificaciones a lo largo de toda su estructura (Figura IV.16). De manera general, los ejemplares estudiados se agruparon según su población de origen, exhibiendo un nivel de mezcla con muestras de otros ríos muy bajo o nulo. Este tipo de topología pone de manifiesto la presencia de una alta estructuración con un escaso flujo genético poblacional generado por alopatria, cuello de botella o por efecto fundador a nivel de río. Los ríos Guadalentín y arroyo del Pueblo constituyeron un grupo diferenciado, no pudiendo distinguir su origen geográfico con este análisis. Por otro lado, los ejemplares analizados de los ríos Guardal, Castril, Guadalentín y Alhorí se agruparon en diferentes ramas del fenograma según su procedencia geográfica. Finalmente, las muestras procedentes del Fardes no se agruparon a partir de un nodo común, distribuyéndose basalmente con respecto al resto de ríos.

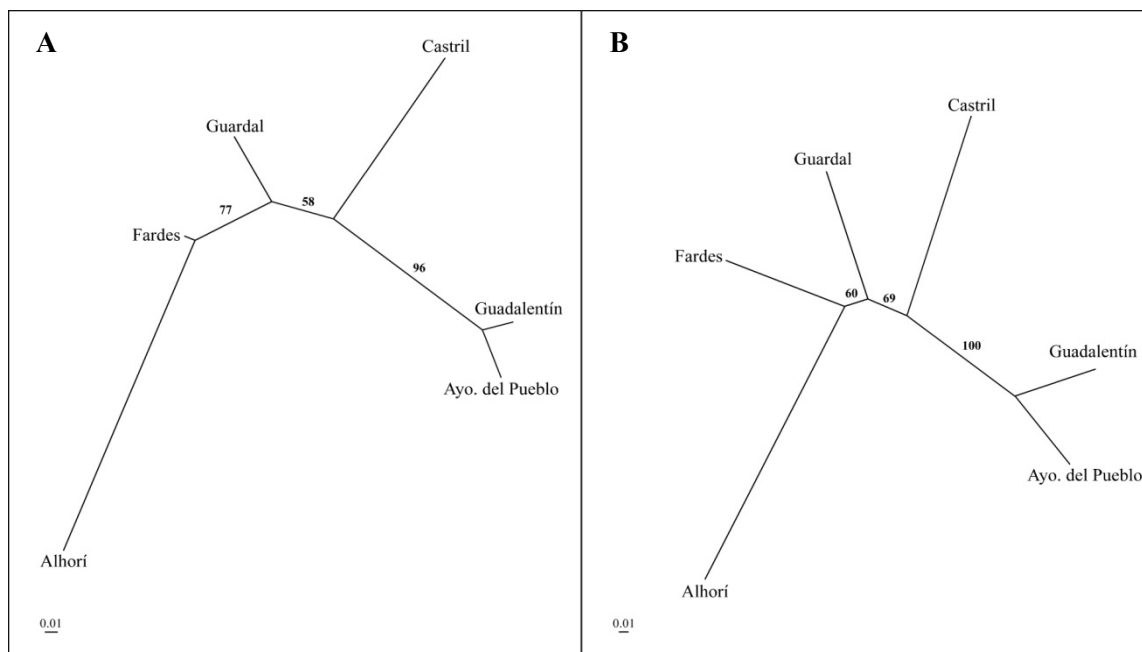


Figura IV.15. Fenogramas basados en las matrices de distancias genéticas de Nei (A) y Cavalli-Sforza (B) y el método de agrupamiento de NJ para el análisis de loci microsatélites en la cuenca del Guadiana Menor. Los valores de *bootstrap* superiores a 60 se indican en las ramas de cada árbol.

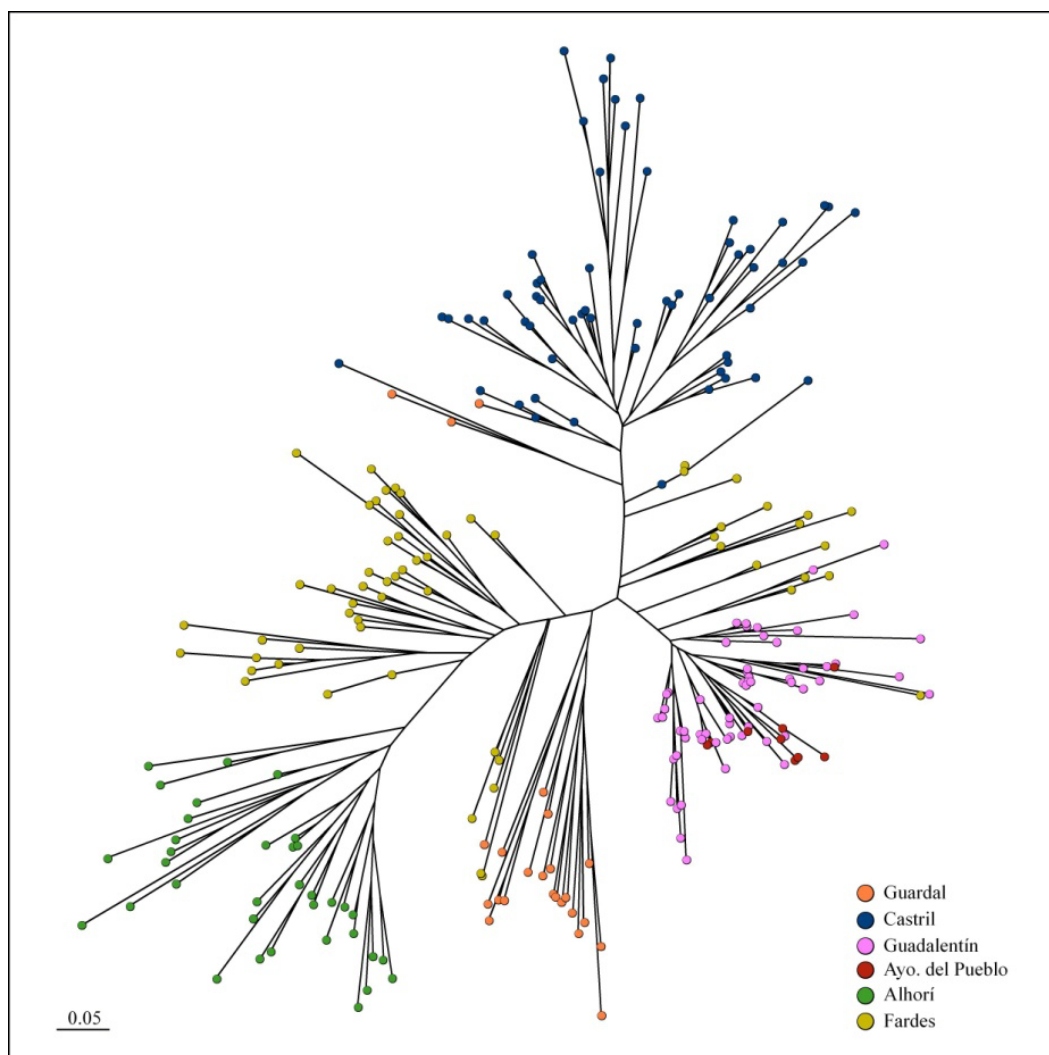


Figura IV.16. Fenogramas basados en el método de agrupamiento de *NJ* a partir de las matrices de distancias genéticas de Nei (**A**) y de Cavalli-Sforza (**B**) entre los ríos de la cuenca del Guadiana Menor, así como entre todos ejemplares analizados (**C**) empleando la matriz de distancias genéticas de Cavalli-Sforza.

IV.3.1.2.2.3. Diferenciación genética interpoblacional en la cuenca del Genil

Los valores de diferenciación genética dentro de la cuenca del Genil fueron los más elevados detectados en la cuenca del Guadalquivir ($R_{ST} = 0,487$). Todos los cursos comparados mostraron valores de divergencia significativos, oscilando entre 0,177 ($p < 0,001$) en los ríos Aguas Blancas y Cacán y 0,809 ($p < 0,001$) entre los ríos Genil y Alhama (Anexo IV). Dentro de los cursos analizados, los resultados obtenidos mostraron una diferenciación pequeña y significativa dentro del río Genil entre las localidades GE2 y GE3 ($R_{ST} = 0,049$, $p < 0,05$). La divergencia intrapoblacional detectada en el río Maitena fue superior, exhibiendo sus dos localidades un valor de R_{ST} elevado ($R_{ST} = 0,270$, $p < 0,001$). En último lugar, los valores de diferenciación genética dentro del río Cacán fueron moderados ($R_{ST} = 0,083$), oscilando entre 0,667 ($p > 0,05$) entre las localidades CA4 y CA6 y 0,203 ($p < 0,001$) entre CA2 y CA8. Los

resultados del análisis de AMOVA mostraron diferencias significativas a todos los niveles jerárquicos estudiados. El elevado nivel de estructuración detectado ($\Phi_{ST} = 0,369$, $p < 0,001$) se relacionó principalmente con la variación existente entre los ríos ($\Phi_{CT} = 0,321$, $p < 0,001$), y en menor medida con los patrones hidrológicos existentes dentro de los propios cursos fluviales ($\Phi_{SC} = 0,071$, $p < 0,001$). El 32% y 5% de la variación encontrada fue debida a las diferencias existentes entre y dentro de los ríos, respectivamente, mientras que el 63% sería explicado por la divergencia entre todas las localidades estudiadas.

Los resultados obtenidos empleando el programa *STRUCTURE* mostraron dentro de la cuenca del Genil una estructuración genética constituida por dos poblaciones parentales ($K=2$), observándose una clara dominancia de un grupo u otro dependiendo del río analizado (Figuras IV.17 y IV.18). Según estos resultados, el río Cacín formaría un grupo altamente diferenciado del resto de cursos en la cuenca, y definido por el grupo 2. Al reanalizar los resultados de este río por separado, se detectó una estructuración genética constituida por dos poblaciones parentales ($K=2$) (Figuras IV.17 y IV.18). La proporción media del grupo 1 en la localidad más aguas arriba fue del 94%, disminuyendo la presencia de este grupo parental progresivamente en dirección aguas abajo. Por otro lado, el grupo 2 mostró una distribución inversa al anterior, observándose en la localidad CA12 las mayores proporciones medias encontradas (94%). Dentro del Cacín, el río Añales (CA11) y el Cacín en Coto Cacín (CA12) mostraron unas proporciones medias del grupo 2 superiores al 87%, pudiendo ser asignados dentro del mismo grupo parental. Sin embargo, al realizar un nuevo análisis agrupando estas localidades, los ejemplares se separaron en dos grupos diferenciados ($K=2$) según su tramo de origen (Figuras IV.17 y IV.18). En relación a los resultados obtenidos en el primer análisis, la matriz de datos de los ríos asignados al grupo 1 fue reanalizada, observándose una fuerte estructuración genética definida por ocho poblaciones parentales ($K=8$) (Figuras IV.17 y IV.18). De esta manera, los ríos Aguas Blancas (grupo 1), Monachil (grupo 3), Dílar (grupo 8) y Alhama (grupo 2) formarían grupos altamente diferenciados definidos por distintos grupos parentales. Por otro lado, los cursos del Genil y Maitena no pudieron ser asignados a una única población parental. El Genil mostró unas proporciones intermedias de los grupos 4 y 7, sin que se observase subestructuración poblacional entre sus localidades. Por otro lado, aunque a nivel global el río Maitena presentó unas proporciones medias similares de los grupos 5 y 6, cada uno de ellos fue asignado a un tramo distinto dentro del propio río, mostrando por tanto unos niveles de diferenciación intrapoblacional muy elevados y similares a los encontrados entre los ríos de la cuenca.

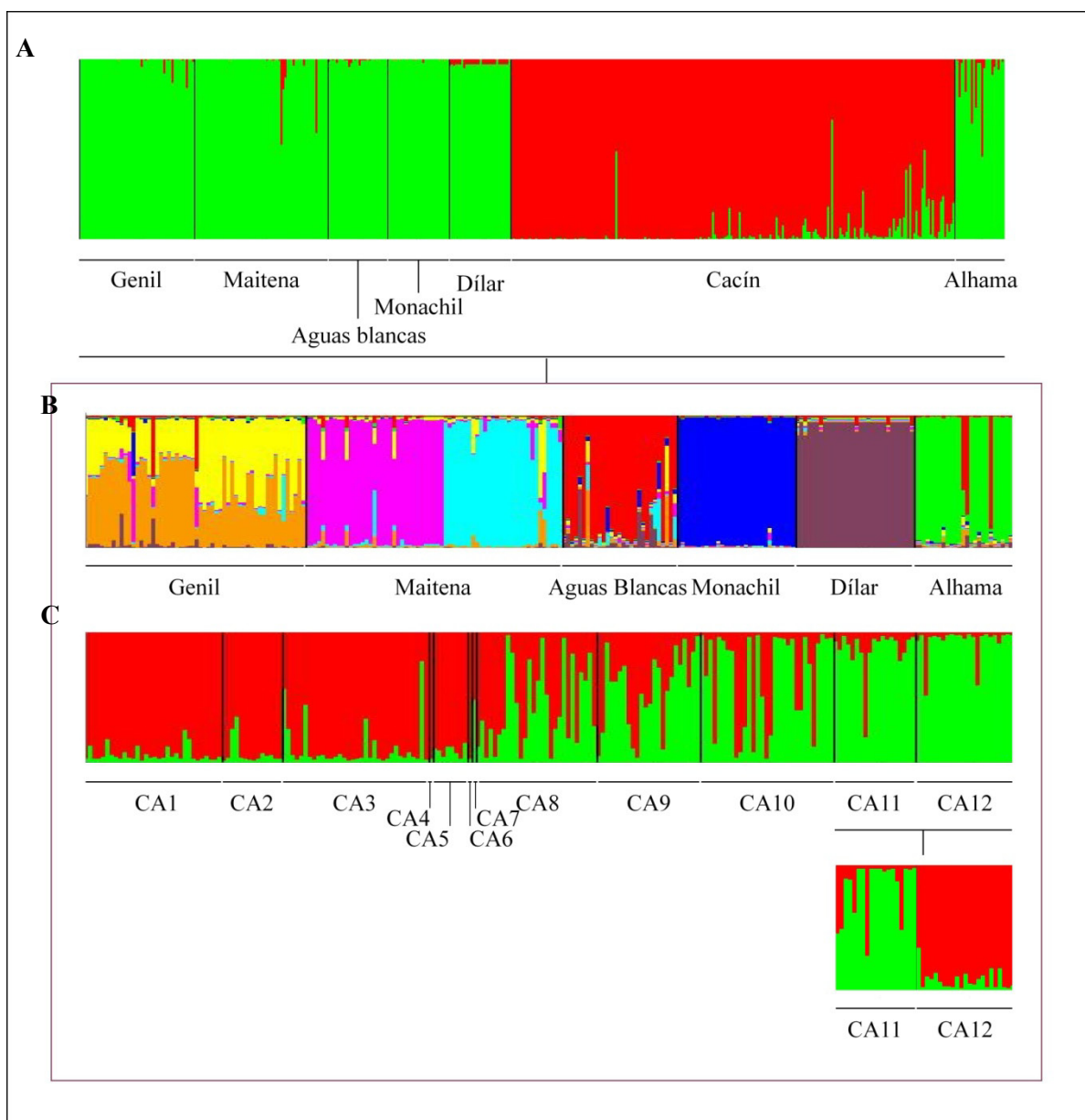


Figura IV.17. Estructura genética estimada por el programa *STRUCTURE* y validada por el test de Evanno para los ejemplares analizados en la cuenca del Genil (**A**) y en los ríos Genil, Maitena, Aguas Blancas, Monachil, Dílar, Alhama (**B**) y Cacín (**C**).

IV. Diversidad y estructuración genética en el sur de la Península Ibérica

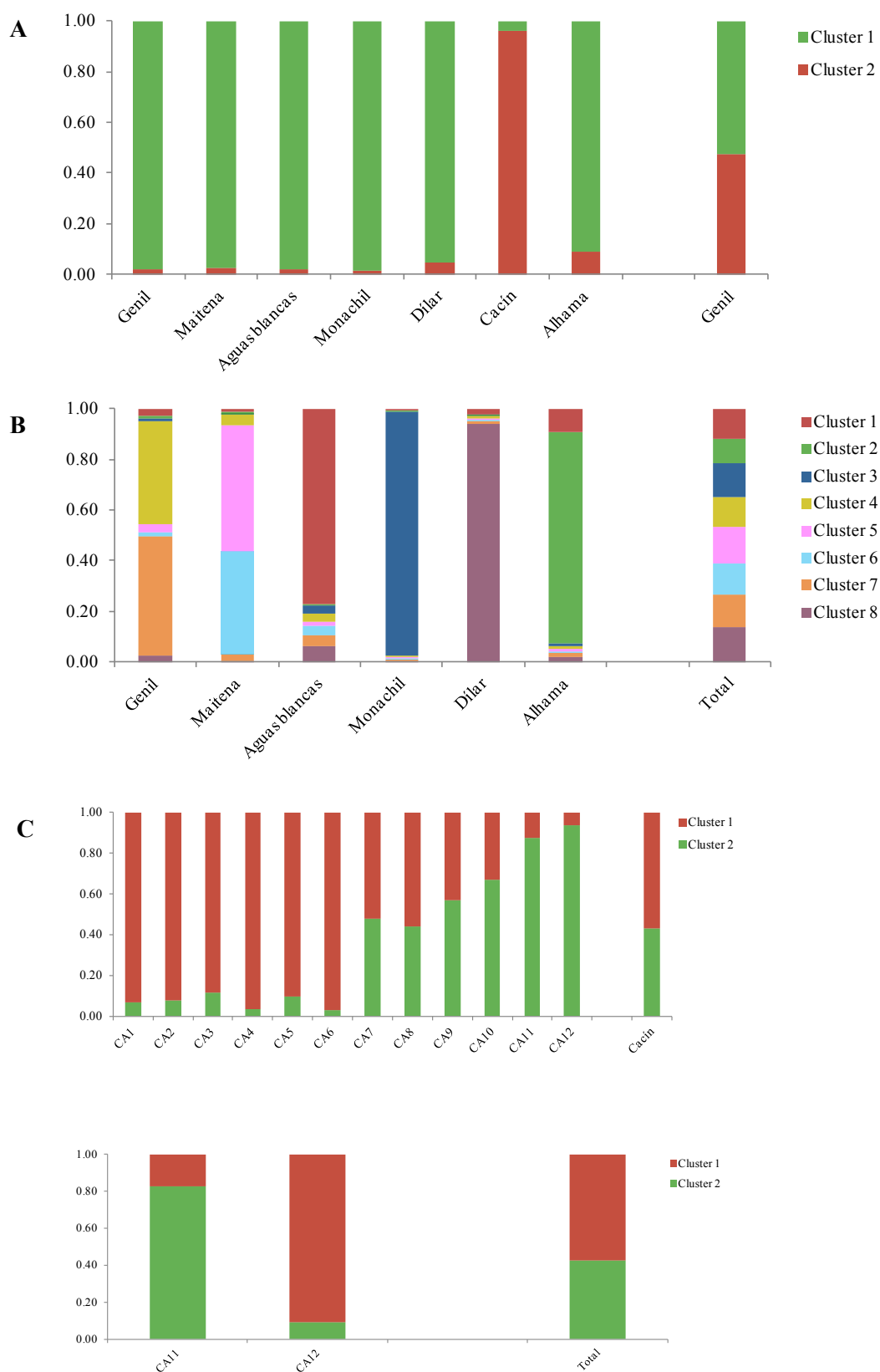


Figura IV.18. Proporción media de cada grupo definido en la cuenca del Genil (A) y en los ríos Genil, Maitena, Aguas Blancas, Monachil, Dilar, Alhama (B) y Cacin (C).

La estructuración entre los ríos de la cuenca del Genil ha sido resumida en dos fenogramas, generados a partir de las matrices de distancias genéticas D_A y D_C y el método de agrupamiento NJ (Figura IV.19). Ambas reconstrucciones mostraron topologías similares, presentando ligeras variaciones tanto en la longitud de las ramas como en los valores de soporte según la matriz empleada. Los valores de *bootstrap* obtenidos entre los ríos Monachil y Cacán fueron elevados, constituyendo un grupo diferenciado. El río Alhama se situó basalmente con respecto a estos ríos, mostrando un valor de soporte bajo. El resto de agrupaciones encontradas presentaron soportes débiles inferiores al 70%, observándose una mayor proximidad entre los ríos Genil y Maitena y los cursos del Aguas Blancas y Dílar. Al analizar cada ejemplar por separado, el fenograma obtenido mostró una topología típica de árbol, presentando numerosas ramificaciones a lo largo de toda su estructura (Figura IV.20). Dentro de esta cuenca los ríos presentaron un nivel de mezcla genética bajo, existiendo pocos nodos con ejemplares de distinta procedencia geográfica. De manera general, los ejemplares estudiados parecieron seguir un patrón hidrográfico a nivel de río, presentando cada curso fluvial numerosas ramificaciones a partir de cada uno de sus nodos basales. Las truchas muestreadas en los ríos Monachil y Alhama se dispusieron en el fenograma a partir de nodos compartidos con ejemplares del río Cacán. Por otro lado, el río Dílar mostró una mayor cercanía genética con algunos ejemplares de los ríos Genil y Aguas Blancas, agrupándose estas muestras a partir del mismo nodo. Por otro lado, no se detectó estructuración dentro de cada río estudiado, salvo el caso del Maitena, pudiendo observarse una ligera tendencia de algunos ejemplares pertenecientes a las localidades MA1 y MA3 a agruparse en diferentes ramas del fenograma dentro del propio río. Finalmente, la separación de algunos ejemplares del río Genil no pareció ser debida a la diferenciación entre sus localidades sino a la propia variabilidad existente dentro de este curso.

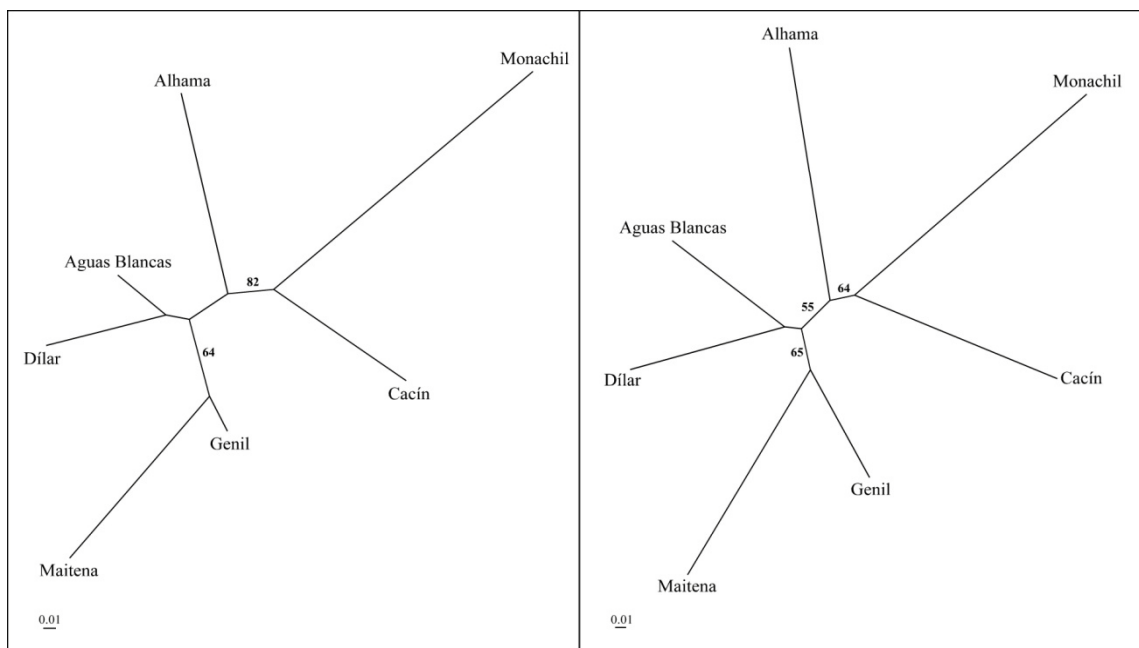


Figura IV.19. Fenogramas basados en las matrices de distancias genéticas de Nei (A) y Cavalli-Sforza (B) y el método de agrupamiento de NJ para el análisis de loci microsatélites en la cuenca del Genil. Los valores de *bootstrap* superiores a 60 se indican en las ramas cada árbol.

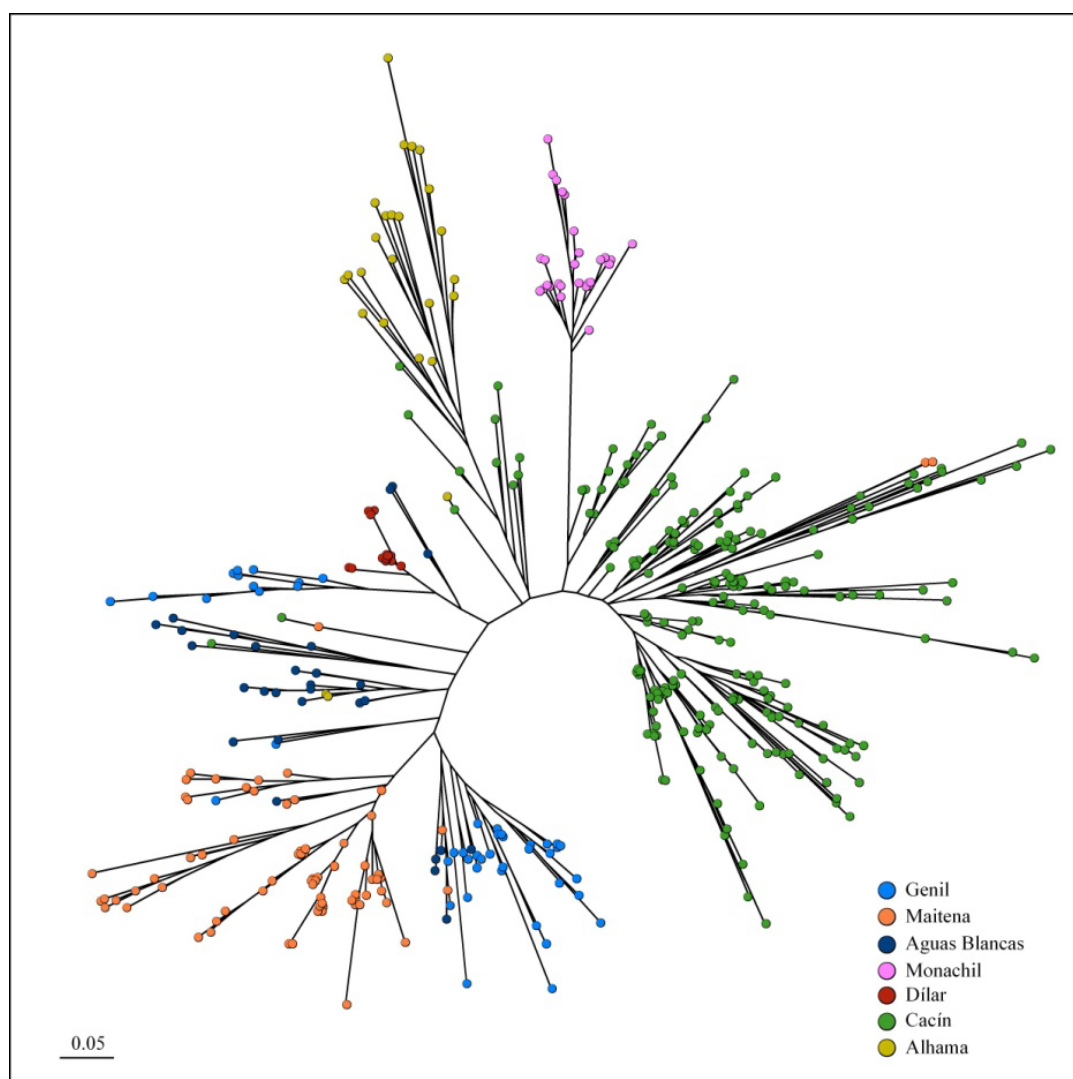


Figura IV.20. Fenograma basado en la matriz de distancias genéticas de Cavalli-Sforza y el método de agrupamiento de *NJ* para el análisis de loci microsatélites en los ejemplares analizados de la cuenca del Genil.

IV.3.1.3. Aislamiento poblacional por distancia

Los resultados obtenidos en el test de Mantel mostraron la existencia de una correlación positiva y significativa entre las distancias genéticas y geográficas dentro de la cuenca del Guadalquivir, tanto a nivel mitocondrial ($r = 0,312$, $p < 0,001$) como nuclear ($r = 0,292$, $p < 0,001$). Las matrices comparadas de distancia genética F_{ST} y distancia geográfica dentro de cada cuenca no mostraron este patrón de aislamiento por distancia observado a nivel global. Los ríos pertenecientes al Alto Guadalquivir y Gadiana Menor mostraron un único haplotipo compartido, mientras que en la cuenca del Genil se detectó una correlación positiva entre la distancia genética y geográfica, aunque no significativa ($r = 0,312$, $p > 0,05$). Por otro lado, los resultados obtenidos al comparar las matrices de distancia genética R_{ST} y distancia geográfica fueron ligeramente distintos. De hecho, aunque este patrón de aislamiento fue observado dentro de la cuenca del Alto Guadalquivir ($r = 0,837$, $p < 0,01$), las cuencas del Gadiana Menor y

Genil no presentaron una correlación significativa al comparar ambas matrices ($r = 0,212$, $p > 0,05$ y $r = 0,082$, $p > 0,05$; respectivamente).

IV.3.1.4. Historia demográfica

Se contrastaron los procesos demográficos recientes tanto a nivel global como dentro de cada cuenca y cada río analizados. Los ríos pertenecientes al Alto Guadalquivir y Guadiana Menor mostraron un único haplotipo mitocondrial en sus cursos. De la misma manera, no se detectó variación haplotípica dentro de cada río en la cuenca del Genil. Este hecho incumple las premisas de los modelos y test empleados, por lo que no pudieron estimarse los estadísticos de neutralidad y la distribución de diferencias genéticas entre pares de poblaciones.

Los valores de los estadísticos D de Tajima, F^* y D^* de Fu y Li, y F_S de Fu, no se desviaron significativamente del modelo de neutralidad de Wright–Fisher, sin que se detectara ninguna fuerza evolutiva o demográfica en las poblaciones comparadas (Tabla IV.5).

El análisis de los resultados de la distribución *Mismatch* en la cuenca del Genil (Tabla IV.5) no permitió inferir ningún acontecimiento de expansión demográfica ($P_{SSD} < 0,05$; $r = 0,173$). Por el contrario, las poblaciones de la cuenca del Guadalquivir no se pueden descartar eventos de ($P_{SSD} > 0,05$). Este resultado consistente con el índice de *Rageness* obtenido ($r = 0,092$) y, por ello, son adecuados para el análisis de los patrones demográficos. Este grupo presentó una distribución *Mismatch* unimodal (Figura IV.21), estimándose la edad relativa de expansión aproximada entre 18.800 y 37.500 años para una tasa de sustitución nucleotídica del 1 y 2% por millón de años, respectivamente.

Tabla IV.5. Pruebas de neutralidad y parámetros demográficos estimados por el análisis de *Mismatch* considerando un modelo de expansión repentina en la cuenca del Genil y en la cuenca del Guadalquivir. Parámetros demográficos: (τ) edad de expansión en unidades de tiempo mutacional, (θ_0) tamaño poblacional antes, y (θ_I) después de la expansión, (P_{SSD}) probabilidad de observar al azar un ajuste entre la distribución mismatch observada y esperada, (r) índice de *Raggedness*. Los intervalos de confianza se indican entre paréntesis.

Parámetros	Genil	Cuenca del Guadalquivir
D de Tajima	1,285 n.s.	1,746 n.s.
F^* de Fu	1,016 n.s.	1,162 n.s.
D^* de Fu y Li	0,682 n.s.	0,621 n.s.
F_S de Fu	1,655 n.s.	2,488 n.s.
τ	0,887 (0,623-1,479)	1,520 (0-4,010)
θ_0	0 (0-0,090)	0 (0-0,417)
θ_I	99,999 (12,672-99,999)	1,537 (0,372-99,999)
P_{SSD}	0,022	0,533
r	0,173	0,092

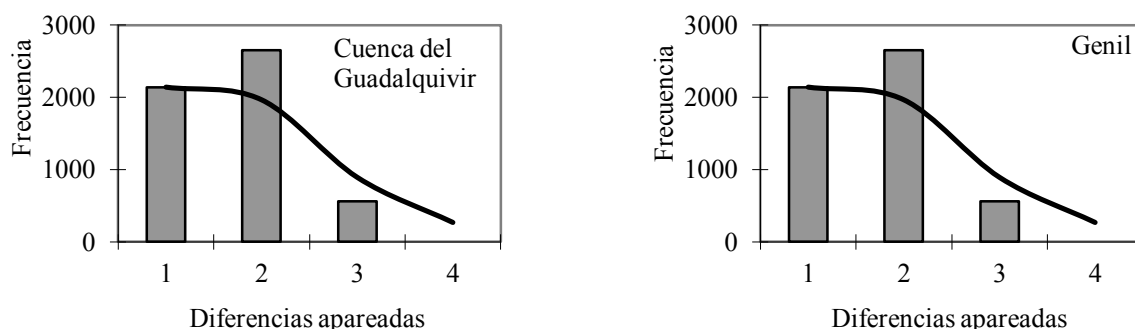


Figura IV.21. Distribuciones *Mismatch* para la cuenca del Genil y Guadalquivir. Las barras verticales muestran la distribución de las diferencias observadas y la línea continua la distribución esperada bajo un modelo de expansión repentina de Rogers (1995) y modificada por Schneider y Excoffier (1999).

Considerando un modelo de mutación TPM y comparando los resultados obtenidos con el test de Wilcoxon, cinco localidades y dos de los ríos estudiados mostraron signos de cuello de botella reciente (Tabla IV.6 y IV.7), con un exceso significativo de heterocigosis en los loci analizados. Los valores de significación obtenidos con el modelo SMM fueron más conservados, detectándose únicamente un exceso de heterocigosis en la cabecera del Fardes. Por otro lado, los ríos Guardal, Alhorí, Genil y Cacán mostraron un déficit de heterocigotos significativo (Tabla IV.7), confirmándose estos resultados por los dos modelos empleados en los ríos Genil y Cacán. Al emplear el modelo SMM a nivel de cuencas y vertiente se obtuvo un resultado similar, mostrando valores significativos de una posible expansión poblacional.

Tabla IV.6. Valores de significación estimados (p) en el análisis de fenómenos de cuello de botella en la cuenca del Alto Guadalquivir bajo los modelos de mutación por pasos (SMM) y mutación en dos pasos (TPM) con una proporción de SMM del 70% para un exceso ($H_e > H_{eq}$) y déficit ($H_e < H_{eq}$) de heterocigosis. Los valores de p significativos ($p < 0,05$) se indican en negrita.

Cuenca	Río	Localidad	TPM		SMM	
			$p (H_e > H_{eq})$	$p (H_e < H_{eq})$	$p (H_e > H_{eq})$	$p (H_e < H_{eq})$
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	GU1	0,852	0,188	0,961	0,055
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	GU2	0,020	0,986	0,273	0,770
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I		0,527	0,527	0,727	0,320
Alto Guadalquivir	Borosa	BO2	0,219	0,922	0,422	0,656
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	AG1	0,039	0,977	0,219	0,922
Alto Guadalquivir	Guadalquivir II	GU4	0,766	0,289	0,813	0,234
Alto Guadalquivir	Aguascebas	AC2	0,148	0,945	0,289	0,766

IV. Diversidad y estructuración genética en el sur de la Península Ibérica

Tabla IV.7. Valores de significación estimados (p) en el análisis de fenómenos de cuello de botella en las cuencas del Guadiana Menor y Genil considerando los modelos de mutación por pasos (SMM) y mutación en dos pasos (TPM) con una proporción de SMM del 70% para un exceso ($H_e > H_{eq}$) y déficit ($H_e < H_{eq}$) de heterocigosis. Los valores de p significativos ($p < 0.05$) se indican en negrita.

Cuenca	Río	Localidad	TPM		SMM	
			$p (H_e > H_{eq})$	$p (H_e < H_{eq})$	$p (H_e > H_{eq})$	$p (H_e < H_{eq})$
G. Menor	Guardal	GR1	0,578	0,473	0,998	0,004
G. Menor	Castril	CS1	0,055	0,961	0,078	0,945
G. Menor	Castril	CS2	0,273	0,770	0,578	0,473
G. Menor	Castril		0,422	0,629	0,902	0,125
G. Menor	Guadalentín	GD3	0,500	0,594	0,500	0,594
G. Menor	Guadalentín	GD4	0,766	0,289	0,813	0,234
G. Menor	Guadalentín		0,711	0,344	0,945	0,148
G. Menor	Arroyo del Pueblo	PU1	0,563	0,563	0,844	0,438
G. Menor	Alhorí	AH1	-	-	-	-
G. Menor	Alhorí	AH2	0,527	0,527	0,809	0,230
G. Menor	Alhorí	AH3	0,527	0,527	0,809	0,230
G. Menor	Alhorí		0,527	0,527	0,980	0,027
G. Menor	Fardes	FA1	0,008	1,000	0,008	1,000
G. Menor	Fardes	FA2	0,023	0,984	0,344	0,719
G. Menor	Fardes		0,008	1,000	0,078	0,945
Genil	Genil	GE1	0,998	0,004	0,998	0,004
Genil	Genil	GE2	0,996	0,006	0,998	0,004
Genil	Genil	GE4	0,998	0,004	1,000	0,002
Genil	Genil		0,996	0,006	0,996	0,006
Genil	Maitena	MA1	0,844	0,438	0,844	0,438
Genil	Maitena	MA3	0,531	0,531	0,711	0,344
Genil	Maitena		0,629	0,422	0,963	0,098
Genil	Aguas blancas	AB1	0,055	0,961	0,422	0,656
Genil	Monachil	MO1	0,844	0,438	0,844	0,438
Genil	Dílar	DI1	1,000	0,125	1,000	0,125
Genil	Cacín	CA1	0,406	0,688	0,500	0,594
Genil	Cacín	CA2	0,125	0,938	0,125	0,938
Genil	Cacín	CA3	0,422	0,656	0,500	0,578
Genil	Cacín	CA4	-	-	-	-
Genil	Cacín	CA5	0,063	0,969	0,094	0,938
Genil	Cacín	CA6	-	-	-	-
Genil	Cacín	CA7	-	-	-	-
Genil	Cacín	CA8	0,813	0,234	0,973	0,039
Genil	Cacín	CA9	0,039	0,973	0,406	0,656
Genil	Cacín	CA10	0,531	0,531	0,766	0,289
Genil	Cacín	CA11	0,945	0,148	0,961	0,055
Genil	Cacín	CA12	0,727	0,320	0,963	0,098
Genil	Cacín		0,994	0,010	0,998	0,004
Genil	Alhama	AL1	0,719	0,344	0,961	0,055

IV.3.1.5. Migración y tamaño efectivo poblacional

Dentro de la cuenca del Guadalquivir, el estudio genético llevado a cabo empleando el programa *MIGRATE-N* mostró un nivel de flujo entre las localidades ($M = 0,829$) y ríos ($M = 0,910$) muy pequeño, oscilando la tasa de migración entre 0,024 y 3,998 (Anexo V). El río Alhorí no presenta barreras físicas naturales o artificiales que impidieran la conexión entre sus localidades, por lo que el valor mínimo de M obtenido ($M = 2,033$) fue empleado como referencia de la mínima migración “potencial” existente dentro de la vertiente. En el conjunto de poblaciones analizadas el flujo genético fue limitado ($M < 2$), detectándose una migración fuertemente asimétrica entre las localidades más próximas geográficamente dentro de los ríos Guadalentín, Alhorí, Fardes, Maitena y Cacán; así como entre algunas localidades de cursos fluviales distintos dentro de la cuenca del Genil (Figura IV.22). La proporción del número de inmigrantes de primera generación fue igualmente baja (0,96%), obteniéndose una tasa de inmigración media utilizando el programa *GENECLASS2* de 0,01. El porcentaje de ejemplares migrantes en las cuencas del Guadiana Menor y Genil fue ligeramente superior (1%), presentando una tasa de inmigración media del 0,012 y 0,013, respectivamente. Por otro lado, no se detectó ningún migrante dentro de la cuenca del Alto Guadalquivir, poniendo de manifiesto el elevado nivel de aislamiento existente.

El tamaño efectivo poblacional estimado en la cuenca del Guadalquivir fue bajo (27,8), oscilando entre 0,7 en la cabecera del río Alhorí y un valor estimado como “infinito” en el río Dilar (Tabla IV.8). Todos los niveles estudiados presentaron tamaños efectivos poblacionales inferiores a 50 ejemplares, con las excepciones del Borosa y Genil en la estación de Maitena, con valores próximos a 100, y el río Dilar con un tamaño muy grande o “infinito”.

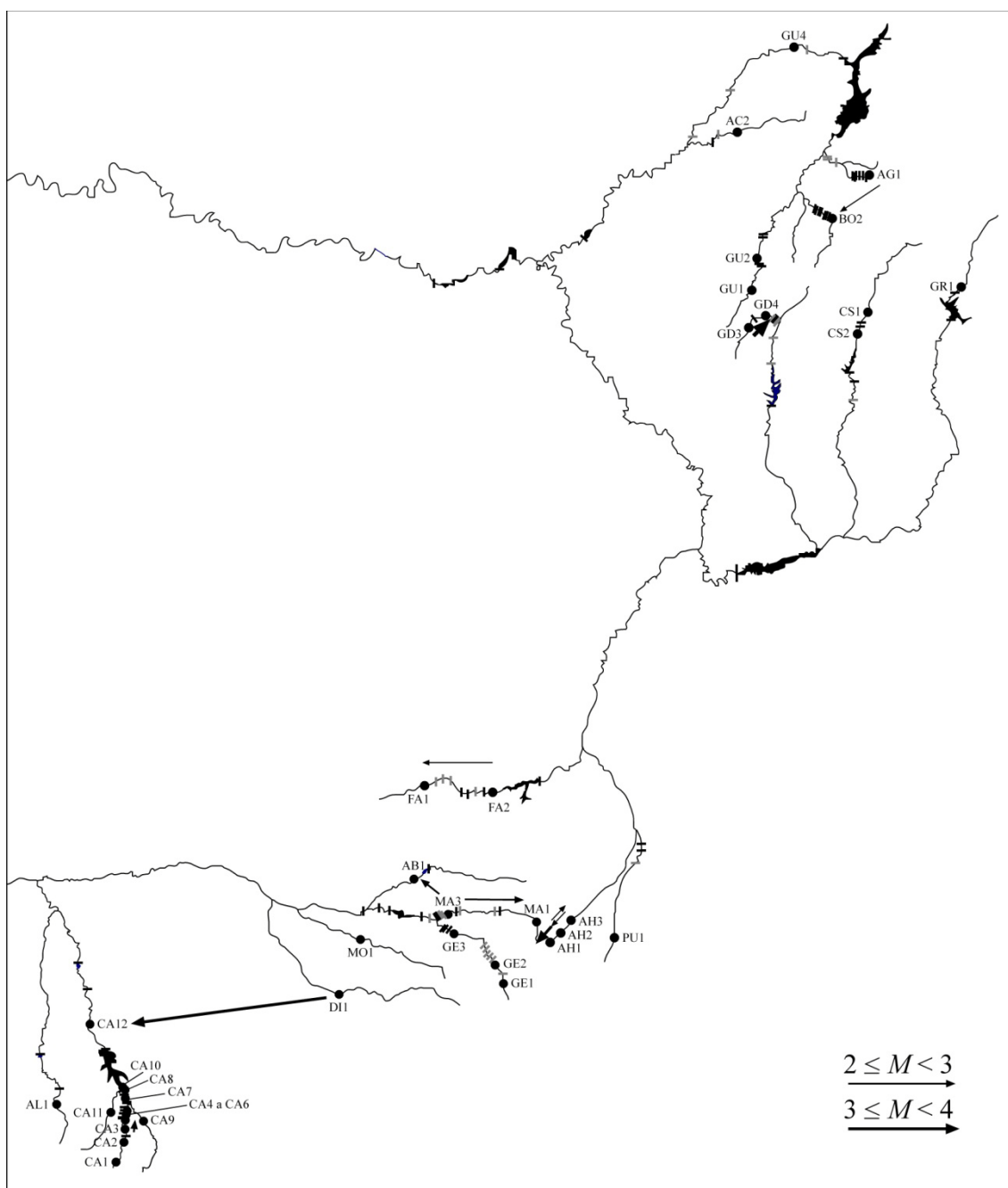


Figura IV.22. Tasa de migración (M) estimada entre las localidades y ríos estudiados en la cuenca del Guadalquivir. La dirección y fuerza de migración son indicadas mediante flechas. No se muestran los valores de $M < 2$. Las barreras infranqueables naturales y artificiales se indican en el mapa empleando barras grises y negras, respectivamente.

Tabla IV.8. Tamaño efectivo poblacional (N_e) en las poblaciones analizadas de la cuenca del Guadalquivir. El intervalo de confianza al 95% asociado (C.I.) se indica entre paréntesis

Cuenca	Río	Localidad	N_e (C.I. 95%)
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	GU1	7,9 (4,7-16,8)
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	GU2	3,600 (2,7-5,1)
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I		10,0 (7,2-14,7)
Alto Guadalquivir	Borosa	BO2	94,8 (22,1-∞)
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	AG1	11,0 (6,3-21,1)
Alto Guadalquivir	Guadalquivir II	GU4	15,4 (9,7-27,9)
Alto Guadalquivir	Aguascebas	AC2	3,9 (2,8-5,5)
Alto Guadalquivir			30,7 (25,4-37,3)
G. Menor	Guardal	GR1	37,0 (21,7-90,7)
G. Menor	Castril	CS1	9,8 (5,5-19,4)
G. Menor	Castril	CS2	4,5 (3,5-5,9)
G. Menor	Castril		5,6 (4,5-7,0)
G. Menor	Guadalentín	GD3	11,2 (5,6-28,2)
G. Menor	Guadalentín	GD4	9,6 (6,3-15,5)
G. Menor	Guadalentín		11,0 (7,8-15,5)
G. Menor	Arroyo del Pueblo	PU1	7,0 (1,9-∞)
G. Menor	Alhorí	AH1	0,7 (0,3-2,0)
G. Menor	Alhorí	AH2	6,9 (4,7-10,7)
G. Menor	Alhorí	AH3	17,9 (10,1-45,2)
G. Menor	Alhorí		20,5 (14,1-32,3)
G. Menor	Fardes	FA1	22,0 (11,3-65,6)
G. Menor	Fardes	FA2	16,4 (9,8-32,9)
G. Menor	Fardes		39,8 (23,7-82,8)
G. Menor			39,8 (23,7-82,8)
Genil	Genil	GE1	4,2 (2,9-6,4)
Genil	Genil	GE2	15,6 (7,6-65,9)
Genil	Genil	GE4	99,1 (25,6-∞)
Genil	Genil		23,4 (17,2-33,1)
Genil	Maitena	MA1	2,4 (1,1-4,6)
Genil	Maitena	MA3	2,6 (1,8-3,5)
Genil	Maitena		3,2 (2,5-4,1)
Genil	Aguas blancas	AB1	14,2 (8,1-30,0)
Genil	Monachil	MO1	8,3 (3,9-21,1)
Genil	Dílar	DI1	∞ (5,8-∞)
Genil	Cacín	CA1	27,0 (9,8-∞)
Genil	Cacín	CA2	14,6 (2,7-∞)
Genil	Cacín	CA3	14,2 (7,6-31,9)
Genil	Cacín	CA4	-
Genil	Cacín	CA5	3,3 (1,2-19,4)
Genil	Cacín	CA6	-
Genil	Cacín	CA7	-
Genil	Cacín	CA8	6,7 (4,6-10,1)
Genil	Cacín	CA9	8,3 (5,3-14,1)
Genil	Cacín	CA10	26,9 (15,4-62,4)
Genil	Cacín	CA11	22,2 (9,6-291,2)
Genil	Cacín	CA12	44,1 (22,6-205,2)
Genil	Cacín		23,8 (20,7-27,3)
Genil	Alhama	AL1	14,5 (8,6-29,2)
Genil			19,6 (17,9-21,3)

IV.3.2. Estructura genética poblacional en la cuenca del Guadalfeo

IV.3.2.1. Diversidad genética intrapoblacional

En la cuenca del Guadalfeo se detectaron para la región D-Loop cinco haplotipos nativos pertenecientes a las líneas evolutiva *Adriática-Suribérica* (**AD_{SI}1**, **AD_{SI}4** y **AD_{SI}6**) y *Mediterránea-Ibérica* (**ME_{MI}1** y **ME_{MI}2**), y cuatro haplotipos correspondientes a stocks de piscifactoria (**AT_{EX}1**, **AT_{EX}2**, **AT_{EX}3** y **AT_{EX}4**), existiendo por tanto introgresión genética de material genético alóctono en el ADN mitocondrial en algunos de los ríos estudiados. Los linajes nativos fueron más abundantes que los de origen alóctono, presentando unas frecuencias del 75 y 25%, respectivamente. La distribución geográfica y las frecuencias de cada haplotipo autóctono encontrado se muestran en la Figura IV.23. Excluyendo las secuencias foráneas, el linaje *Adriático-Suribérico* presentó una frecuencia en la cuenca del 89%, mientras que la línea *Mediterránea-Ibérica* mostró una frecuencia del 11%. El linaje *Adriático-Suribérico* presentó una alta frecuencia en todos los ríos analizados, con la única excepción del río Chico de Soportújar, mientras que la línea *Mediterránea-Ibérica* mostró una distribución más restringida, detectándose en los ríos Lanjarón y Chico de Soportújar (Figura IV.23). Un 67% de los ejemplares nativos fueron clasificados dentro del haplotipo **AD_{SI}4**, un 17% a la secuencia **AD_{SI}6** mientras que el 5% fue asignado como **AD_{SI}1**. La secuencia **AD_{SI}6** presentó una distribución restringida al río Lanjarón, correspondiendo al haplotipo **AD_{CS}6** definido previamente por Cortey *et al.* 2004 en este mismo río y en la cuenca del Ebro. Con respecto al linaje *Mediterráneo-Ibérico*, los haplotipos pertenecientes a este linaje evolutivo presentaron una distribución restringida a los ríos Chico de Soportújar y Lanjarón, mostrando la secuencia **ME_{MI}2** una frecuencia del 10% en la cuenca, mientras que el 1% de los ejemplares nativos fueron asignados al haplotipo **ME_{MI}1**. Estas secuencias concuerdan respectivamente con los haplotipos **ME1** y **ME2** descritos inicialmente por Suárez *et al.* (2001). Al analizar cada río por separado, los cursos del Grande de Berchules, Trevélez y Poqueira presentaron una composición haplotípica nativa constituida por un único haplotipo (Figura IV.23). Sin embargo, los valores de diversidad haplotípica detectados en los ríos Chico de Soportújar y Lanjarón fueron intermedios ($H = 0,286 \pm 0,196$ y $H = 0,154 \pm 0,126$, respectivamente) y altos en el Torrente ($H = 0,533 \pm 0,095$), mientras que la diversidad nucleotídica mostró unos valores bajos en estos cursos fluviales ($\pi_n \leq 0,001 \pm 0,001$). Finalmente, los valores de diversidades haplotípica y nucleotídica en todo el Guadalfeo fueron elevados ($H = 0,522 \pm 0,061$, $\pi_n = 0,002 \pm 0,001$).

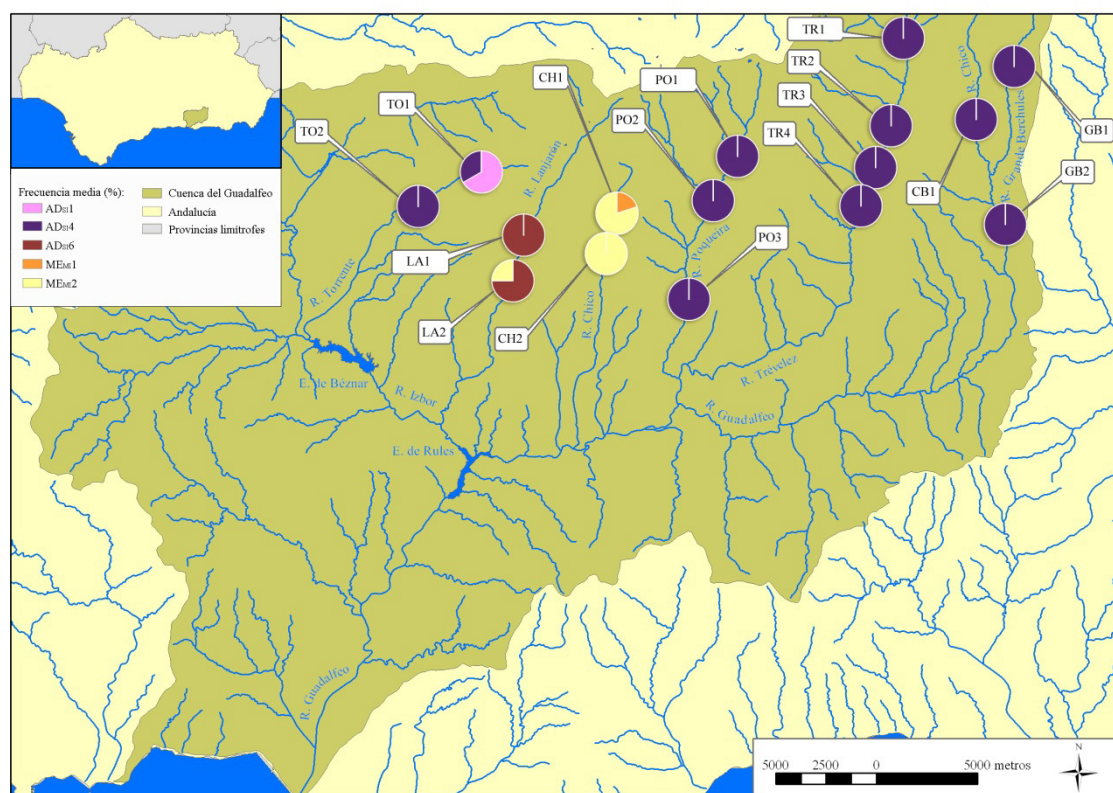


Figura IV.23. Posición geográfica y frecuencias de los diferentes haplotipos nativos de Trucha Común en la cuenca del Guadalfeo.

Por otro lado, el análisis de los ocho microsatélites analizados permitió identificar 54 variantes alélicas en la cuenca, detectándose 14 alelos correspondientes a stocks de piscifactoría (Anexo III). Estas formas alélicas de origen exótico mostraron una alta incidencia en los ríos analizados, con la excepción del Trevélez y Poqueira, mostrando algunos alelos foráneos frecuencias alélicas superiores al 5% (Figura IV.24). Los ríos mostraron una diversidad genética inferior a la encontrada globalmente en la cuenca del Guadalfeo (Tabla IV.9). Los valores de variabilidad genética variaron dependiendo del río analizado, mostrando los ríos Trevélez y Poqueira unos niveles inferiores al resto de cursos fluviales, y el río Torrente los máximos encontrados (Tabla IV.9). Por otro lado, 10 de los 48 análisis realizados mostraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas. Al agrupar los loci analizados, los valores de F_{IS} fueron positivos y significativos en los ríos Grande de Bércules, Poqueira y Torrente, mientras que los cursos del Trevélez, Chico de Soportújar y Lanjarón no se desviaron significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los histogramas de las frecuencias alélicas obtenidas mostraron diferentes patrones de distribución dependiendo del microsatélite y río analizado (Figura IV.24). Excluyendo las variante alóctonas y aquellos alelos con frecuencias inferiores al 5%, los loci Str60 y Str73 exhibieron en la cuenca una distribución unimodal, los microsatélites Str15, Ssa197 y BFRO 2 un patrón bimodal, mientras que los loci Ssa85, SSOSL417 y SSOSL438 mostraron una distribución de frecuencias multimodal. A nivel de río, el 54% de los cursos estudiados no mostrando el patrón de distribución descrito a nivel de cuenca (Figura IV.24). Al comparar los ríos estudiados, se detectaron diferencias en las variantes alélicas nativas más frecuentes en seis de los ocho loci analizados (Figura IV.24). De esta manera, el alelo Str15*220 mostró una mayor frecuencia en todos los ríos estudiados en la cuenca, con la excepción del Torrente, que mostró unas frecuencias próximas al 20% para las variantes *220, *222 y *226. Los loci Ssa85 y Ssa197 permitieron diferenciar el río Lanjarón del resto de cursos fluviales, mostrando unas mayores frecuencias de los alelos *112 y *144 para cada uno de estos loci, respectivamente. El alelo *197 del locus SSOSL417 mostró una mayor frecuencia en los cursos del Chico de Soportújar, Lanjarón y Torrente; el alelo *201 permitió agrupar el Grande de Bérchules con Trevélez, mientras que la variante *209 mostró una frecuencia del 60% en el Poqueira. El microsatélite SSOSL438 exhibió una mayor frecuencia de la variante *97 en los ríos Poqueira, Chico de Soportújar y Torrente; mientras que los alelos *101, *103 y *111 fueron mayoritarios en los cursos del Grande de Bérchules, Lanjarón y Trevélez. Finalmente, el locus BFRO 002 mostró la variante *113 en alta frecuencia en el Grande de Bérchules, Trevélez y Poqueira, separando estos ríos del Chico de Soportújar, Lanjarón y Torrente, con una mayor frecuencia del alelo **117. Las diferencias entre las distintas formas alélicas mayoritarias fueron debidas a entre uno y cuatro saltos mutacionales entre ellas. En la cuenca del Guadalfeo se detectaron dos variantes alélicas exclusivas del río Lanjarón (SSOSL417*167 y SSOSL438*119), sin que estas fueran encontradas en el resto de cursos fluviales analizados en la presente tesis. Por otro lado, el Guadalfeo presentó siete alelos exclusivos de río dentro de la propia cuenca, pero compartidos con las cuencas estudiada de la cuenca del Guadalquivir y Segura (Capítulos IV.3.1 y IV.3.3). Las variante alélica Str73*134 presentó una distribución restringida dentro del Guadalfeo al río Trevélez, Ssa197*158 al Torrente, Ssa197*154 y SSOSL417*195 al Chico de Soportújar, SSOSL417*199 y *203 al río Lanjarón, mientras que el alelo SSOSL438*101 permitió diferenciar al Grande de Bérchules del resto de cursos fluviales.

IV. Diversidad y estructuración genética en el sur de la Península Ibérica

Tabla IV.9. Parámetros de diversidad genética poblacional estimados para la Trucha Común en los ríos analizados de la cuenca del Guadalfeo. Parámetros estimados: número de ejemplares analizados (N), número de alelos (A), riqueza alélica (A_R), alelos privados (P_A), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e) e índice de fijación (F_{IS}). Las desviaciones significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas bajo el equilibrio de H-W son indicadas por medio de asteriscos (Valores de significación: $*$ = $p < 0,05$, $**$ = $p < 0,01$, $***$ = $p < 0,001$).

		<i>Str15</i>	<i>Str60</i>	<i>Str73</i>	<i>Ssa85</i>	<i>Ssa197</i>	<i>SSOSL417</i>	<i>SSOSL438</i>	<i>BFRO 002</i>	Total
Grande de Bérchules	<i>N</i>	48	49	49	49	49	26	32	33	49
	<i>A</i>	5	3	2	4	5	3	4	2	3,500
	<i>A_R</i>	4,334	2,313	2,000	3,530	4,737	3,000	4,000	2,000	3,239
	<i>P_A</i>	0,186	0,098	0,068	0,054	0,242	0,584	1,492	0,000	0,340
	<i>H_o</i>	0,583	0,061	0,347	0,551	0,490	0,423	0,250	0,242	0,369
	<i>H_e</i>	0,573	0,060	0,313	0,535	0,628	0,470	0,600	0,298	0,435
	<i>F_{IS}</i>	-0,8**	-0,014	-0,1	-0,020	0,230	0,120	0,594	0,200	0,165**
Trevélez	<i>N</i>	30	30	30	30	30	28	28	30	30
	<i>A</i>	1	1	2	1	1	2	2	1	1,375
	<i>A_R</i>	1,000	1,000	1,867	1,000	1,000	2,000	2,000	1,000	1,250
	<i>P_A</i>	0,000	0,000	0,133	0,000	0,000	0,000	0,119	0,000	0,030
	<i>H_o</i>	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,214	0,107	0,000	0,044
	<i>H_e</i>	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,191	0,163	0,000	0,048
	<i>F_{IS}</i>	-	-	-	-	-	-0,102	0,357	-	0,101
Poqueira	<i>N</i>	33	33	33	33	33	33	28	32	33
	<i>A</i>	1	1	1	1	1	3	2	1	1,375
	<i>A_R</i>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	2,788	2,000	1,000	1,280
	<i>P_A</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,347	0,000	0,000	0,040
	<i>H_o</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,485	0,286	0,000	0,096
	<i>H_e</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,495	0,477	0,000	0,122
	<i>F_{IS}</i>	-	-	-	-	-	0,037	0,416*	-	0,224*
Chico de Soportújar	<i>N</i>	41	47	46	45	46	35	41	43	48
	<i>A</i>	3	3	3	5	8	10	3	2	4,625
	<i>A_R</i>	3,000	2,717	2,919	4,971	7,893	9,195	2,954	1,605	4,410
	<i>P_A</i>	0,036	0,197	0,037	0,249	0,685	1,724	0,017	0,000	0,370
	<i>H_o</i>	0,512	0,106	0,217	0,578	0,652	0,829	0,390	0,023	0,410
	<i>H_e</i>	0,508	0,102	0,199	0,624	0,692	0,749	0,384	0,023	0,414
	<i>F_{IS}</i>	0,4	-0,031	-0,083	0,086*	0,068	-0,091	-0,400	0,000	0,4
Lanjarón	<i>N</i>	58	58	58	55	57	58	58	58	58
	<i>A</i>	4	3	4	4	5	9	5	1	4,375
	<i>A_R</i>	3,448	1,897	3,353	3,889	5,000	7,126	4,133	1,000	3,730
	<i>P_A</i>	0,158	0,067	0,269	0,175	1,130	1,303	0,756	0,000	0,480
	<i>H_o</i>	0,603	0,035	0,172	0,618	0,719	0,586	0,345	0,000	0,385
	<i>H_e</i>	0,535	0,034	0,177	0,512	0,777	0,653	0,364	0,000	0,382
	<i>F_{IS}</i>	-0,119	-0,4	0,034	-0,198*	0,083*	0,111	0,061	-	0,0
Torrente	<i>N</i>	47	49	49	49	47	47	48	48	49
	<i>A</i>	5	2	4	5	8	9	6	2	5,125
	<i>A_R</i>	5,000	2,000	3,782	4,782	6,738	8,254	5,699	2,000	4,780
	<i>P_A</i>	0,368	0,416	0,786	0,152	1,404	0,385	0,867	0,000	0,550
	<i>H_o</i>	0,660	0,265	0,429	0,714	0,489	0,787	0,563	0,208	0,514
	<i>H_e</i>	0,796	0,230	0,580	0,676	0,703	0,786	0,684	0,305	0,595
	<i>F_{IS}</i>	0,181*	-0,143	0,27*	-0,047	0,314*	0,900	0,187**	0,326*	0,146**
Cuenca del Guadalfeo	<i>N</i>	257	266	265	261	262	227	235	244	267
	<i>A</i>	5	3	5	5	11	15	8	2	6,750
	<i>A_R</i>	5,000	3,000	4,857	5,000	10,862	15,000	8,000	2,000	6,710
	<i>P_A</i>	3,103	1,313	1,987	3,307	4,020	4,644	4,253	1,984	3,080
	<i>H_o</i>	0,448	0,087	0,223	0,467	0,450	0,586	0,349	0,078	0,336
	<i>H_e</i>	0,560	0,083	0,275	0,672	0,704	0,810	0,780	0,481	0,546
	<i>F_{IS}</i>	0,202***	-0,037	0,192**	0,307***	0,362***	0,278***	0,554***	0,839***	0,386**

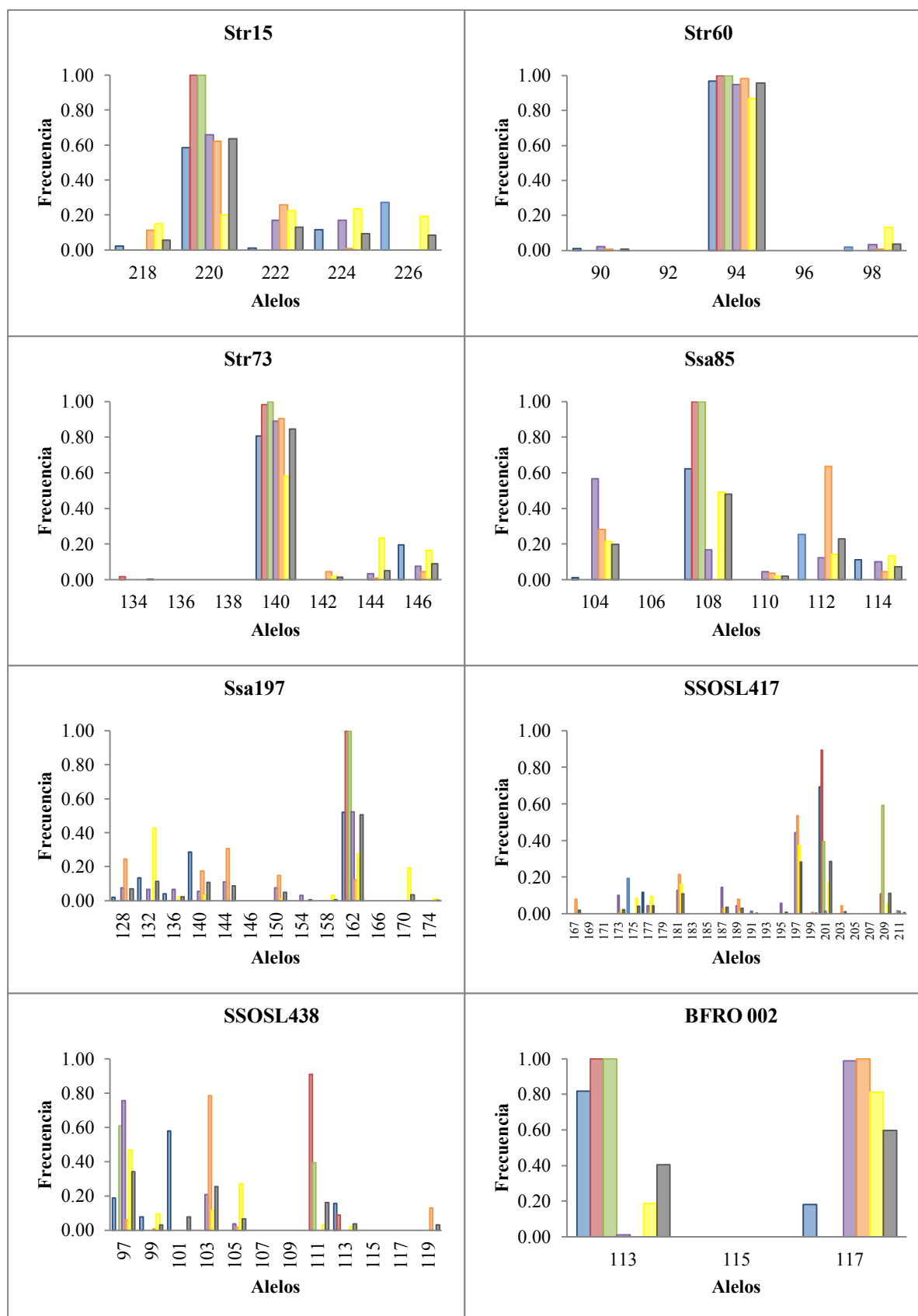


Figura IV.24. Frecuencias alélicas obtenidas para los ocho loci microsatélites analizados en los ríos Grande de Bércules ■, Trevélez ■, Poqueira ■, Chico de Soportújar ■, Lanjarón ■ y Torrente ■; así como en toda la cuenca del Guadalfeo ■

IV.3.2.2. Diferenciación genética interpoblacional

IV.3.2.2.1. Diferenciación genética interpoblacional mitocondrial

Los niveles de diferenciación genética entre los ríos analizados fueron elevados ($F_{ST} = 0,610$), oscilando el índice F_{ST} entre 0 entre el Grande de Bérchules, Trévélz y Poqueira; y 0,987 en la comparación de los cursos del Trévélz y Chico de Soportújar (Anexo IV). Los altos valores de F_{ST} indicaron la existencia de una alta y significativa estructura interpoblacional dentro de la cuenca del Guadalfeo, poniendo de manifiesto la ausencia de flujo génico entre sus ríos. La excepción fue encontrada entre los ríos Grande de Bérchules, Trévélz y Poqueira, que no presentaron diferencias genéticas entre ellos.

Los resultados del análisis de AMOVA mostraron que el 85,5% de la variación genética en la cuenca fue debida a las diferencias entre sus ríos, mientras que el 11% pudo explicarse por las divergencias existentes entre las localidades analizadas. Por tanto, el alto nivel de estructuración detectado ($\Phi_{ST} = 0,891$, $p < 0,001$) se relacionó con los patrones hidrológicos existentes tanto entre ($\Phi_{CT} = 0,855$, $p < 0,001$) como dentro de los ríos de estudio ($\Phi_{SC} = 0,248$, $p < 0,05$).

La estructuración entre los ríos analizados se resumió en un fenograma, construido a partir de la matriz de distancias F_{ST} y el método de agrupamiento de distancias NJ (Figura IV.25). Los altos valores de F_{ST} (Anexo IV) apoyaron las agrupaciones observadas en dicho árbol. El fenograma muestra un primer conjunto de ríos agrupados por el haplotipo nativo **AD_{SI}4**, incluyendo al Grande de Bérchules, Trévélz y Poqueira. Dentro del río Torrente, la localidad más aguas abajo presentó únicamente el haplotipo **AD_{SI}4**. Sin embargo, este haplotipo mostró una frecuencia menor en la cabecera del Torrente, siendo **AD_{SI}1** la secuencia mayoritaria en este tramo. Aún así, los valores de F_{ST} obtenidos no fueron significativos en la comparación entre ambas localidades y sí entre ríos, por lo que el Torrente constituiría un grupo separado y próximo a los cursos del Grande de Bérchules, Trévélz y Poqueira. Por otro lado, el Lanjarón formaría un tercer grupo por la presencia en su cuenca del haplotipo **AD_{SI}6**, único y exclusivo de este río. Finalmente, el último grupo estuvo constituido por el río Chico de Soportújar, debido a la presencia exclusiva de dos haplotipos de la línea nativa *Mediterránea-Ibérica*.

Los resultados del análisis de PCA (Figura IV.26), fueron concordantes con el fenograma obtenido previamente. En este análisis se observa una alta variabilidad explicada por la primera coordenada, tanto a nivel de río (87%) como de localidad (67%). La primera coordenada separó, por un lado a los ríos Poqueira, Trévélz y Grande de Bérchules, y por otro a los cursos del Lanjarón y Chico de Soportújar. El río Torrente se agrupó próximo al primer grupo definido. Sin embargo, al ser realizado el análisis por localidad y no por río, el tramo TO1 de este río se agrupó próximo al Lanjarón y Chico de Soportújar. La segunda coordenada del análisis permitió diferenciar a nivel de río el Lanjarón y Torrente del resto de cursos fluviales de la cuenca del Guadalfeo. Dentro de esta coordenada, la variabilidad existente dentro del río Torrente separó sus dos localidades, separando a la localidad TO2 y agrupándola próxima a los ríos Poqueira, Trévélz y Grande de Bérchules.

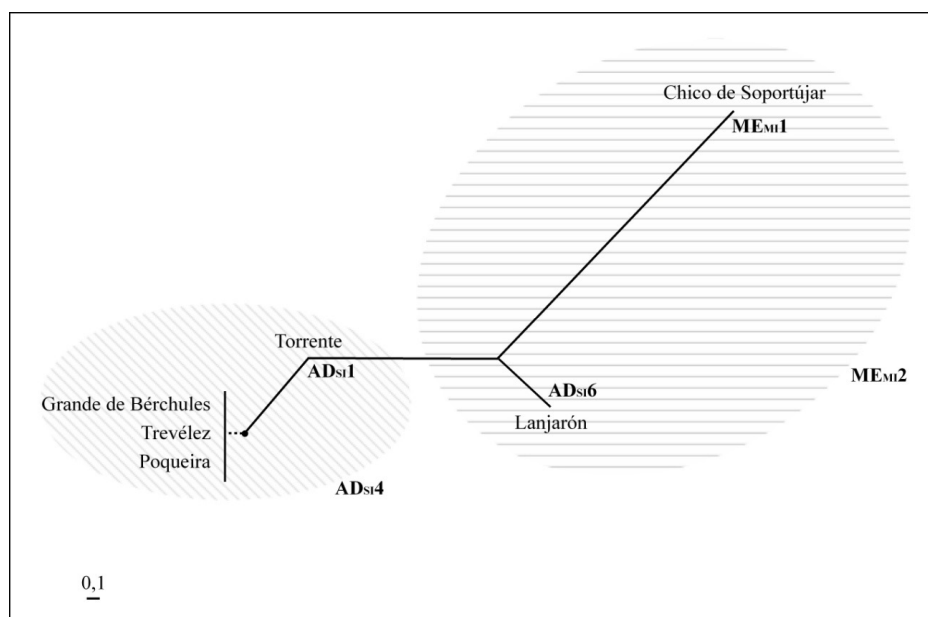


Figura IV.25. Fenograma basado en la matriz de distancias genéticas y el método de agrupamiento de *NJ* para la región D-Loop entre los ríos analizados en la cuenca del Guadalfeo.

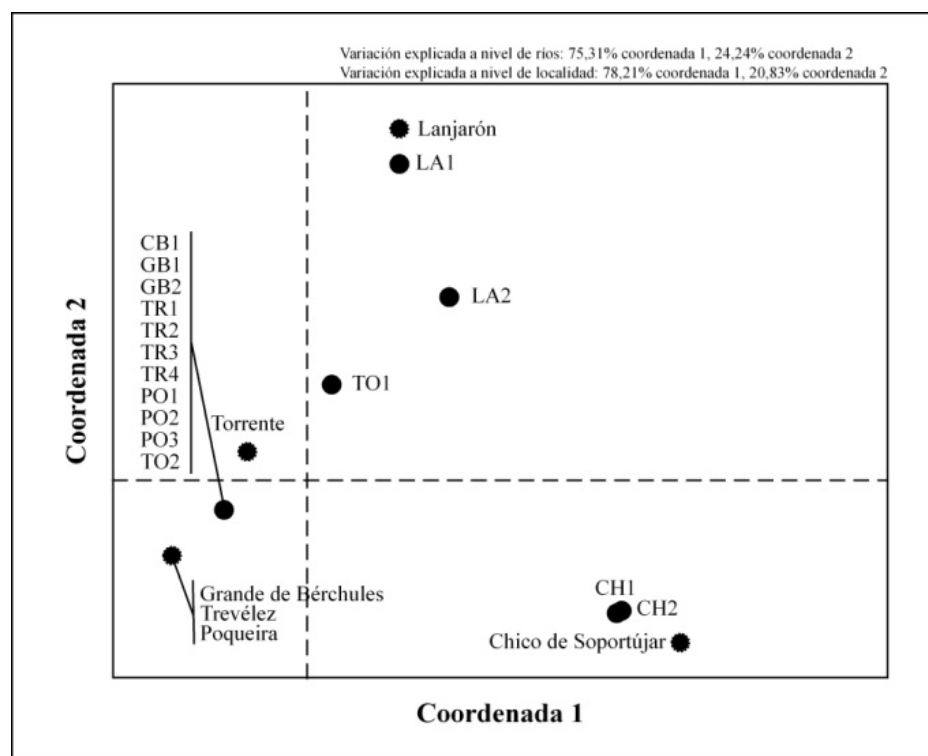


Figura IV.26 PCA (A) basado en la matriz de distancias genéticas F_{ST} entre los ríos (círculos punteados) y localidades analizadas de la cuenca del Guadalfeo.

IV.3.2.2.2. Diferenciación genética interpoblacional nuclear

Los valores de diferenciación genética dentro de la cuenca del Guadalfeo fueron muy elevados ($R_{ST} = 0,277$). La divergencia encontrada osciló entre 0,002 ($p > 0,05$) entre los ríos Trevélez y Poqueira, y 0,710 ($p < 0,001$) para el Poqueira y Lanjarón (Anexo IV). Dentro del río Lanjarón, los resultados obtenidos mostraron una diferenciación moderada y significativa entre sus localidades ($R_{ST} = 0,060$, $p > 0,05$). Por otro lado, la divergencia intrapoblacional detectada en los ríos Chico de Soportújar y Torrente fue superior, exhibiendo valores de R_{ST} elevados ($R_{ST} = 0,188$, $p < 0,001$ y $R_{ST} = 0,116$, $p < 0,01$, respectivamente). Los resultados del análisis de AMOVA mostraron diferencias significativas a todos los niveles jerárquicos estudiados. El alto nivel de estructuración detectado ($\Phi_{ST} = 0,320$, $p < 0,001$) se relacionó principalmente con las diferencias existente entre los ríos analizados ($\Phi_{CT} = 0,226$, $p < 0,05$), y en menor medida con los patrones hidrológicos existentes dentro de los propios cursos fluviales ($\Phi_{SC} = 0,121$, $p < 0,001$). El 23% de la variación encontrada fue debida a las diferencias existentes entre los ríos, mientras que el 68% se explicaría por la divergencia existente entre todas las localidades de estudio.

Los resultados obtenidos empleando el programa *STRUCTURE* mostraron en la cuenca del Guadalfeo una estructuración genética constituida por dos poblaciones parentales ($K=2$), observándose una clara dominancia de un grupo u otro dependiendo del río analizado (Figuras IV.27 y IV.28). Según este resultado, los ríos Grande de Bérchules, Trevélez y Poqueira formarían un primer grupo (grupo 1) diferenciado de los cursos de Chico de Soportújar, Lanjarón y Torrente (grupo 2). Al reanalizar los resultados de este primer grupo por separado fue detectada una estructuración genética constituida por dos poblaciones parentales ($K=2$) (Figura IV.27 y IV.28), separando el río Grande de Bérchules de los cursos del Trevélez y Poqueira. Al volver a reanalizar cada uno de estos dos grupos de manera separada, los resultados obtenidos mostraron signos de sub-estructuración poblacional dentro del Grande de Bérchules (Figuras IV.27 y IV.28), mientras que los ríos Trevélez y Poqueira exhibieron una única población parental de origen. En relación a los resultados obtenidos en el primer análisis, la matriz de datos de los ríos asignados al grupo 2 fue también reanalizada, observándose una fuerte estructuración genética definida por cuatro poblaciones parentales ($K=4$) (Figuras IV.27 y IV.28). De esta manera, los ríos Lanjarón (grupo 1) y Chico de Soportújar (grupo 2) formarían grupos altamente diferenciados. Por otro lado, aunque a nivel global el río Torrente presentó unas proporciones medias similares de los grupos 3 y 4, cada uno de ellos fue asignado a un tramo distinto dentro del propio río, mostrando por tanto unos niveles de diferenciación intrapoblacional muy elevados y similares a los encontrados con los ríos Chico de Soportújar y Lanjarón dentro de esta cuenca.

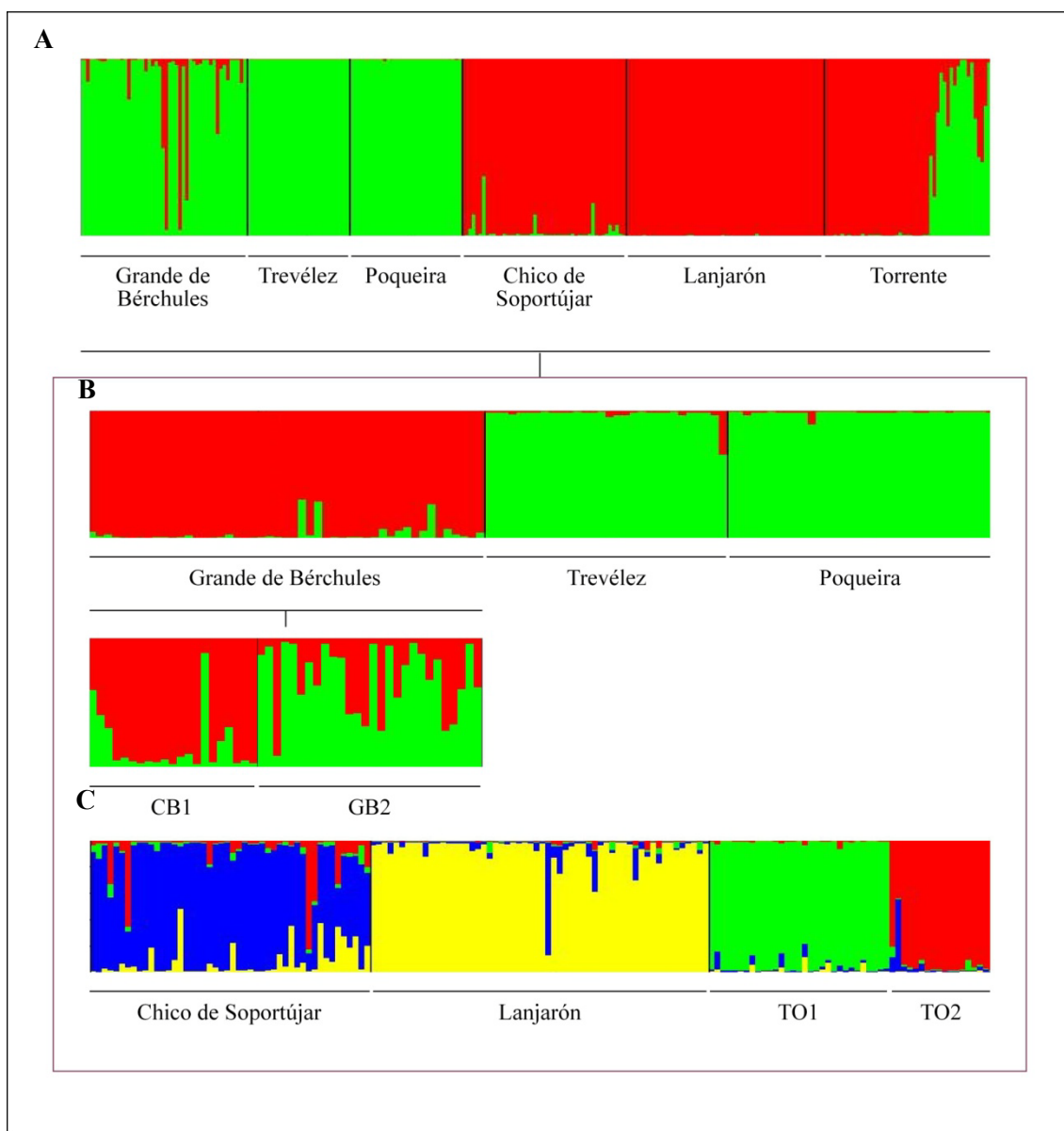


Figura IV.27. Estructura genética estimada por el programa *STRUCTURE* y validada por el test de Evanno para los ejemplares analizados en la cuenca del Guadalfeo (**A**) y en los ríos Grande de Bérchules, Trevélez, Poqueira (**B**), Chico de Soportújar, Lanjarón y Torrente (**C**).

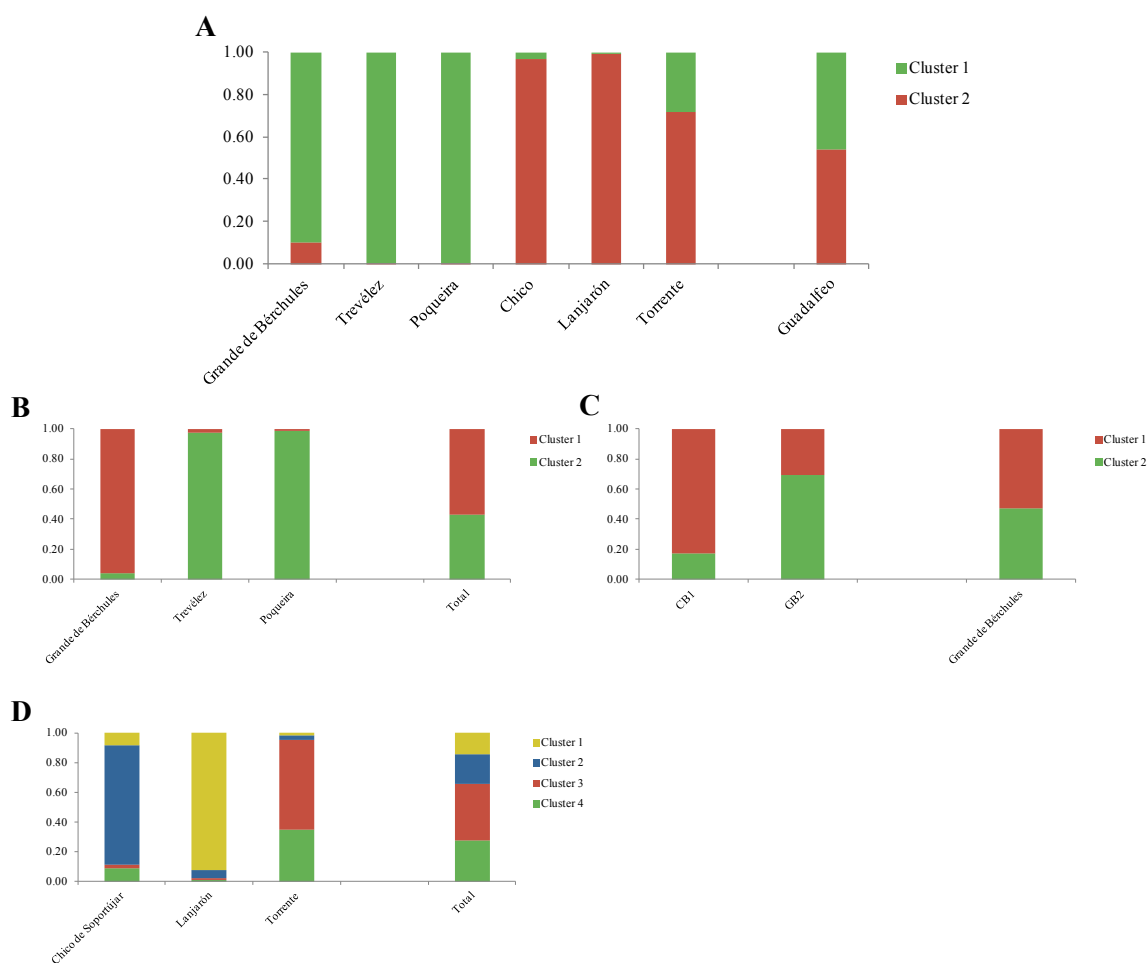


Figura IV.28. Proporción media de cada grupo definido en la cuenca del Guadalefe (A) y en los ríos Grande de Bérchules, Trevélez y Poqueira (B), dentro del Grande de Bérchules (C) y ríos Chico de Soportújar, Lanjarón y Torrente (D).

La estructuración encontrada entre los ríos del Guadalefe ha sido resumida en dos fenogramas, generados a partir de las matrices de distancias genéticas D_A y D_C y el método de agrupamiento NJ (Figura IV.29). Ambas reconstrucciones mostraron topologías similares, obteniéndose unos valores de soporte muy elevados y longitudes de ramas análogas. Los ríos Trevélez y Poqueira constituyeron un grupo altamente diferenciado, situándose el Grande de Bérchules basalmente. Por otro lado, el Chico de Soportújar y Lanjarón mostraron una mayor proximidad en ambos análisis, y a su vez próximos al río Torrente. Al analizar cada ejemplar por separado, el fenograma obtenido mostró una topología típica de árbol, exhibiendo numerosas ramificaciones a lo largo de toda su estructura (Figura IV.29). De manera general, los ejemplares estudiados presentaron un nivel de mezcla genética bajo, existiendo algunos nodos con ejemplares de distinta procedencia hidrográfica. Los ríos Trevélez y Poqueira constituyeron un único grupo diferenciado del resto de ríos, no pudiendo distinguir su origen geográfico con este análisis, agrupándose a partir del mismo nodo a las truchas procedentes del Grande de Bérchules. Por otro lado, los ejemplares del río Lanjarón y Torrente se agruparon en diferentes ramas del fenograma según su origen geográfico. Sin embargo, dentro del Torrente pudo observarse una ligera tendencia en algunos ejemplares pertenecientes al tramo más aguas abajo analizado a agruparse próximos a la muestras del Grande de Bérchules. Finalmente, los

ejemplares del río Chico de Soportújar no se agruparon a partir del mismo nodo, sino que se distribuyeron basalmente al resto de cursos fluviales, próximos a los ríos Lanjarón y Torrente.

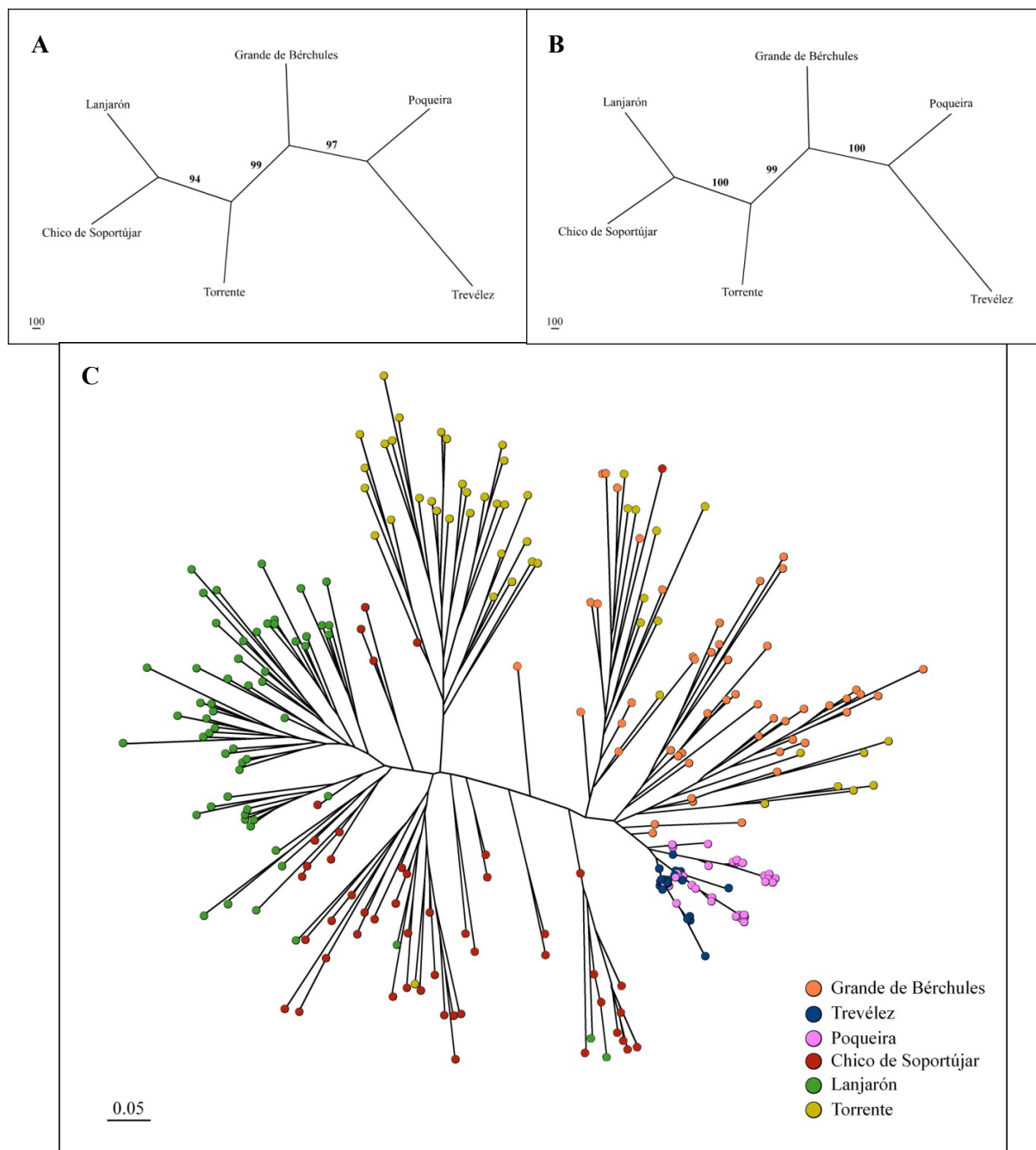


Figura IV.29. Fenogramas basados en el agrupamiento de *NJ* a partir de las matrices de distancias genéticas de Nei (**A**) y de Cavalli-Sforza (**B**) entre los ríos de la cuenca del Guadalfeo, así como entre todos ejemplares analizados (**C**) empleando la matriz de distancias genéticas de Cavalli-Sforza. Los valores de *bootstrap* superiores a 60 obtendios en (**A**) y (**B**) se indican en las ramas cada árbol.

El resultado obtenido en el análisis de PCA (Figura IV.30) fue, en general, concordante con los fenogramas previos, detectándose una mayor proximidad del río Grande de Bérchules a los ríos Chico de Soportújar y Torrente, no mostrada previamente observados. En este análisis, la primera coordenada explicó un alto porcentaje de la varianza, tanto a nivel de río (83%) como de localidad (75%). Este eje separó los ríos Poqueira y Trevélez del resto de cursos analizados en la cuenca. Sin embargo, al ser realizado el análisis por localidad y no por río, los tramos TO2 y CH1 de los ríos Torrente y Chico de Soportújar, respectivamente se agruparon en el mismo lado del eje que el Poqueira y Trevélez. Las poblaciones se distribuyeron a lo largo de esta coordenada por la presencia de alelos compartidos en alta frecuencia. Los resultados obtenidos fueron determinados por la variación alélica encontrada en todos los loci estudiados, presentando una variabilidad superior al 68%. La segunda coordenada del análisis agrupó en el mismo lado del eje por un lado a los ríos Lanjarón, Poqueira y Trevélez, y por otro a los ríos Torrente, Chico de Soportújar y Grande de Bérchules. Dentro de esta coordenada, la variabilidad existente dentro del río Torrente separó sus dos localidades a ambos lados del eje, agrupando a la localidad TO2 próxima a los ríos Chico de Soportújar y Grande de Bérchules. Los ríos se distribuyeron principalmente en función de la variabilidad de frecuencias alélicas encontradas en los loci Str15, BFRO 002, SSOSL417 y SSOSL438, mostrando estos microsatélites una variación superior al 20%. La proximidad entre los ríos Trevélez y Poqueira y su separación del resto de cursos fluviales se observó en siete de los ocho loci analizados. Sin embargo, el análisis de PCA empleando el locus SSOSL438 por separado mostró una mayor proximidad entre el río Poqueira y los ríos Grande de Bérchules, Chico de Soportújar y Torrente, generada por la presencia en frecuencias intermedias del alelo compartido *97.

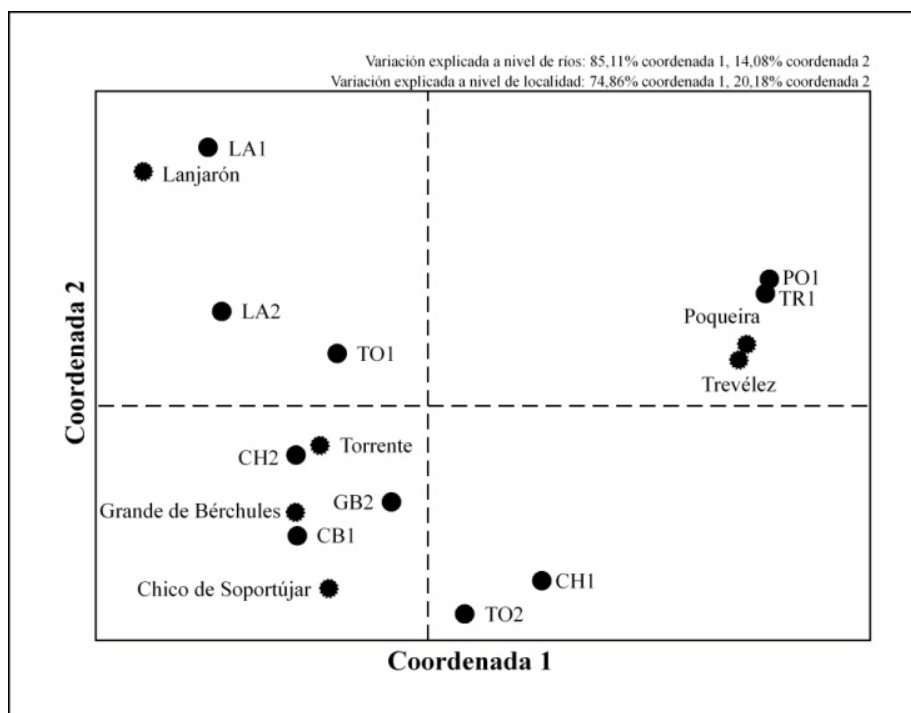


Figura IV.30. PCA basado en la matriz de distancias genéticas R_{ST} entre los ríos de la cuenca del Guadalfeo.

IV.3.2.3. Aislamiento poblacional por distancia

Los resultados obtenidos en el test de Mantel no detectaron una correlación significativa entre las distancias genéticas y geográficas dentro de la cuenca del Guadalfeo, ni a nivel mitocondrial ($r = 0,010$, $p > 0,05$) ni nuclear ($r = 0,047$, $p > 0,05$).

IV.3.2.4. Historia demográfica

Se contrastaron los procesos demográficos recientes tanto a nivel de cuenca como de río. Los ríos Grande de Bérchules, Trévez y Poqueira mostraron un único haplotipo mitocondrial en sus cursos. Este hecho incumple las premisas de los modelos y test empleados, por lo que no pudieron estimarse, en estos casos, los estadísticos de neutralidad y la distribución de diferencias genéticas entre pares de poblaciones.

A nivel de toda la cuenca, los estadísticos D de Tajima, F^* y D^* de Fu y Li, y F_S de Fu no se desviaron significativamente del modelo de neutralidad de Wright–Fisher (Tabla IV.10). Un patrón similar fue encontrado en los ríos Chico de Soportújar y Torrente, sin que se detectara ninguna fuerza evolutiva o demográfica sobre estas poblaciones. En relación al río Lanjarón, los valores de los estadísticos D , F^* y D^* fueron negativos y significativos, mostrando una posible señal de un cuello de botella ($F^* = -2,506$, $p < 0,01$; $D^* = -2,325$, $p < 0,01$) por reducción poblacional ($D = -1,863$, $p < 0,01$) en este río. Por otro lado, los valores obtenidos de F_S en el río Lanjarón no se desviaron de lo esperado bajo un modelo neutral.

El análisis de los resultados de la distribución *Mismatch* en toda la cuenca del Guadalfeo (Tabla IV.10) no permitió inferir ningún acontecimiento de expansión demográfica ($P_{SSD} < 0,001$, $r = 0,310$), presentando una distribución entre pares de poblaciones multimodal consistente con una estabilidad poblacional (Figura IV.31). Las distribuciones de los ríos Chico de Soportújar, Lanjarón y Torrente no se desviaron significativamente de lo esperado por el modelo de expansión repentina ($P_{SSD} > 0,05$), siendo adecuados para el análisis de sus patrones demográficos. Todos estos ríos presentaron una distribución *Mismatch* unimodal (Figura IV.31), estimándose la edad relativa aproximada de expansión, con una tasa de sustitución nucleotídica del 1 y 2% por millón de años, entre 73.700 y 36.800 años para el río Chico de Soportújar, entre 74.100 y 37.100 años para el río Lanjarón y entre 64.000 y 32.000 años para el río Torrente.

Utilizando un modelo de mutación TPM y comparando los resultados obtenidos con el test de Wilcoxon, una localidad (TO1) y un río (Torrente) mostraron signos de cuello de botella reciente (Tabla IV.11), revelado por un exceso significativo de heterocigosis en los loci analizados. Los valores de significación obtenidos bajo el modelo SMM fueron más conservados, sin que se detectara un exceso de heterocigosis en las poblaciones estudiadas. Por otro lado, los ríos Chico de Soportújar y Lanjarón mostraron un déficit de heterocigotos significativo (Tabla IV.11), confirmándose estos resultados con los dos modelos empleados en el Chico de Soportújar. Un resultado similar fue observado empleando el modelo SMM a nivel de cuenca, mostrando valores significativos de déficit de heterocigotos.

Tabla IV.10. Pruebas de neutralidad y parámetros demográficos estimados por el análisis de *Mismatch* considerando un modelo de expansión repentina en la cuenca del Guadalfeo. Parámetros demográficos: (τ) edad de expansión en unidades de tiempo mutacional, (θ_0) tamaño poblacional antes, y (θ_I) después de la expansión, (P_{SSD}) probabilidad de observar al azar un ajuste entre la distribución *Mismatch* observada y esperada, (r) índice *Raggedness*. Los intervalos de confianza son incluidos entre paréntesis. Valores de significación: ** = $p < 0,01$ * = $p < 0,05$.

Parámetros	Chico de Soportújar	Lanjarón	Torrente	Cuenca del Guadalfeo
D de Tajima	-1,006 n.s.	-1,863**	1,642 n.s.	0,583 n.s.
F^* de Fu	-1,049 n.s.	-2,506**	1,310 n.s.	0,637 n.s.
D^* de Fu y Li	-1,102 n.s.	-2,325**	1,026 n.s.	0,518 n.s.
F_s de Fu	-0,095 n.s.	1,907 n.s.	2,338 n.s.	2,673 n.s.
τ	2,982 (0-87,982)	3,000 (0,494-3,0)	2,590 (0-43,400)	0 (0-0,598)
θ_0	0,900 (0-16,777)	0 (0-0,007)	0 (0-3,183)	0 (0-0,028)
θ_I	3,6 (0,235-99999)	0,095 (0-99999)	2,134 (0,180-99999)	99999 (99869-99999)
P_{SSD}	0,058	0,054	0,127	0
r	0,265	0,763	0,787	0,310

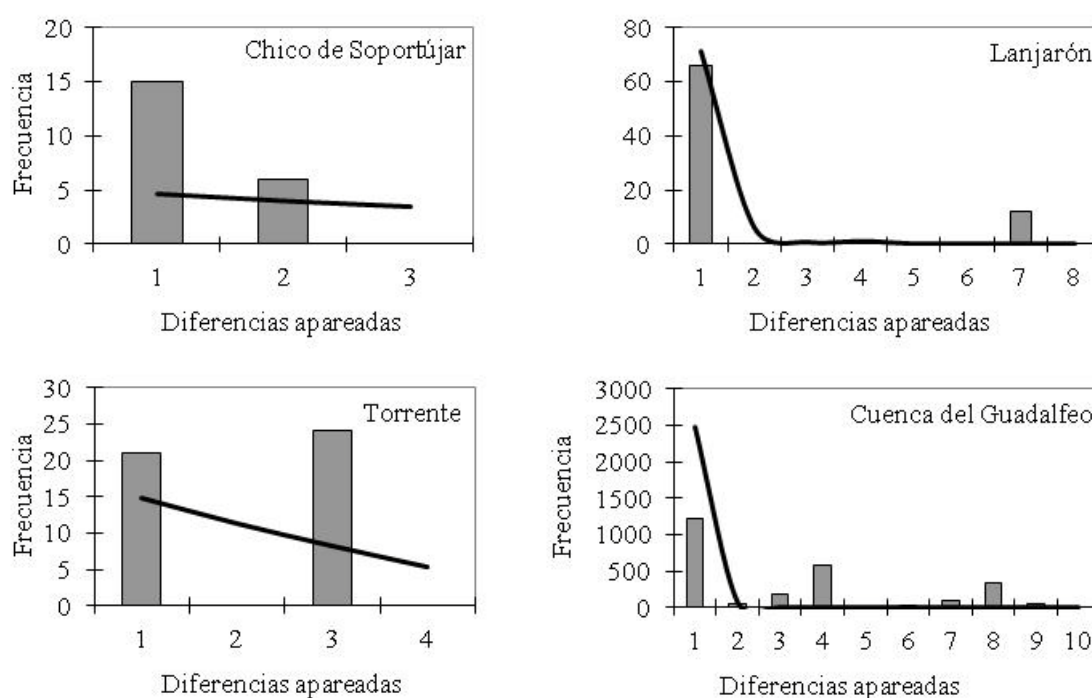


Figura IV.31. Distribuciones *Mismatch* en la cuenca del Guadalfeo. Las barras verticales muestran la distribución de las diferencias observadas y la línea continua la distribución esperada considerando un modelo de expansión repentina de Roger (1995) y modificada por Schneider y Excoffier (1999).

Tabla IV.11. Valores de significación estimados (p) en el análisis de fenómenos de cuello de botella en la cuenca del Guadalfeo considerando los modelos de mutación por pasos (SMM) y mutación en dos pasos (TPM) con una proporción de SMM del 70% para un exceso ($H_e > H_{eq}$) y déficit ($H_e < H_{eq}$) de heterocigosis. Los valores de p significativos ($p < 0,05$) se indican en negrita.

Cuenca	Río	Localidad	TPM		SMM	
			$p (H_e > H_{eq})$	$p (H_e < H_{eq})$	$p (H_e > H_{eq})$	$p (H_e < H_{eq})$
Guadalfeo	Grande de Bérchules	CB1	0,231	0,809	0,578	0,473
Guadalfeo	Grande de Bérchules	GB2	0,098	0,963	0,231	0,889
Guadalfeo	Grande de Bérchules		0,125	0,902	0,844	0,191
Guadalfeo	Trevélez	TR1	1,000	0,063	1,000	0,063
Guadalfeo	Poqueira	PO1	0,250	0,125	0,250	0,125
Guadalfeo	Chico de Soportújar	CH1	0,973	0,039	0,998	0,020
Guadalfeo	Chico de Soportújar	CH2	0,844	0,191	0,998	0,004
Guadalfeo	Chico de Soportújar		0,981	0,027	0,998	0,004
Guadalfeo	Lanjarón	LA1	0,719	0,344	0,922	0,219
Guadalfeo	Lanjarón	LA2	0,656	0,406	0,945	0,148
Guadalfeo	Lanjarón		0,945	0,148	0,988	0,020
Guadalfeo	Torrente	TO1	0,040	0,973	0,594	0,469
Guadalfeo	Torrente	TO2	0,809	0,231	0,973	0,037
Guadalfeo	Torrente		0,014	0,990	0,527	0,527

IV.3.2.5. Migración y tamaño efectivo poblacional

Dentro de la cuenca del Guadalfeo, el estudio genético empleando el programa *MIGRATE-N* mostró un nivel de flujo entre las localidades ($M = 0,769$) y ríos ($M = 0,781$) muy pequeño, oscilando la tasa de migración entre 0,018 y 2,736 (Anexo V). Todos los ríos presentaron barreras físicas naturales o artificiales que impiden la conexión entre sus localidades, por lo que el valor de M obtenido entre las localidades del río Alhorí en la cuenca del Guadalquivir (capítulo IV.1.4) se utilizó como referencia de la mínima migración “potencial”. El flujo genético fue limitado ($M < 2$) en el conjunto de localidades analizadas, detectándose una migración fuertemente asimétrica dentro del río Grande de Bérchules así como entre la localidad GB2 y el río Poqueira (Figura IV.32). La proporción del número de inmigrantes de primera generación fue igualmente baja (1,5%), obteniéndose una tasa de inmigración media de 0,015.

El tamaño efectivo poblacional estimado en la cuenca del Guadalfeo fue bajo (2,900), oscilando entre 1 en la localidad GB2 del Grande de Bérchules y un valor estimado como “infinito” en las cabeceras de los ríos Chico de Soportújar y Lanjarón (Tabla IV.12). Todos los niveles estudiados presentaron valores de N_e inferiores a 50 ejemplares, con las excepciones del río Torrente en la localidad TO2 con un valor ligeramente superior a 50, el río Lanjarón con valores superiores a 100 ejemplares, y las cabeceras del Chico de Soportújar y Lanjarón con un tamaño muy grande o “infinito”.

Tabla IV.12 Tamaño efectivo poblacional (N_e) en los ríos y localidades analizados en la cuenca del Guadalfeo. El intervalo de confianza al 95% asociado (C.I.) se indica entre paréntesis.

Cuenca	Río	Localidad	N_e (C.I. 95%)
Guadalfeo	Grande de Bérchules	CB1	8,7 (5,5-15,0)
Guadalfeo	Grande de Bérchules	GB2	1,0 (0,8-1,2)
Guadalfeo	Grande de Bérchules		6,1 (4,8-7,6)
Guadalfeo	Trevélez	TR1	7,8 (1,9-76,0)
Guadalfeo	Poqueira	PO1	6,3 (0,8-297,8)
Guadalfeo	Chico de Soportújar	CH1	∞ (∞ - ∞)
Guadalfeo	Chico de Soportújar	CH2	6,800 (5,2-9,1)
Guadalfeo	Chico de Soportújar		8,5 (7,0-10,4)
Guadalfeo	Lanjarón	LA1	∞ (43,5- ∞)
Guadalfeo	Lanjarón	LA2	366,5 (51,8- ∞)
Guadalfeo	Lanjarón		125,3 (60,9-989,4)
Guadalfeo	Torrente	TO1	29,4 (17,8-61,8)
Guadalfeo	Torrente	TO2	56,0 (22,6- ∞)
Guadalfeo	Torrente		10,1 (8,5-12,)
Guadalfeo			2,9 (2,4-3,8)

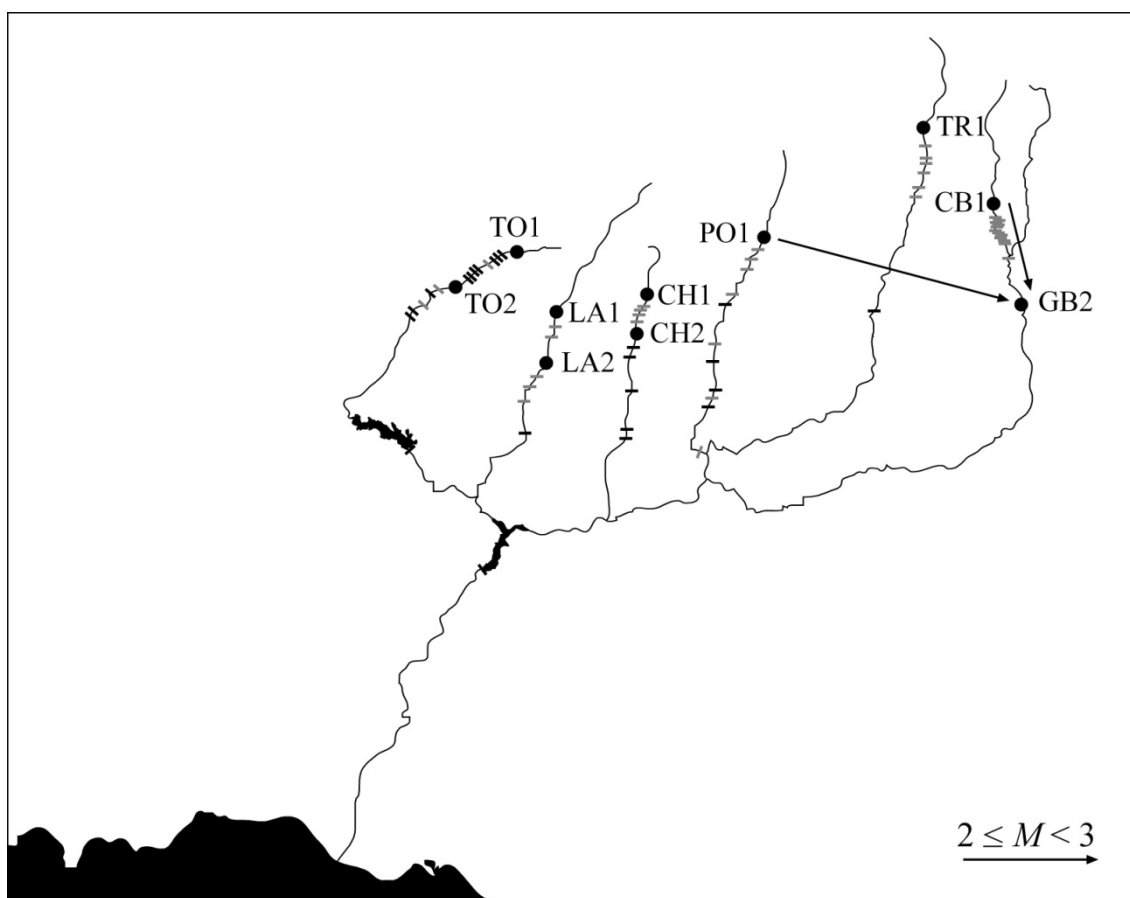


Figura IV.32. Tasa de migración (M) estimada entre las localidades y ríos estudiados en la cuenca del Guadalfeo. La dirección y fuerza de migración son indicadas mediante flechas. No se muestran valores de $M < 2$. Las barreras infranqueables naturales y artificiales se indican en el mapa como barras grises y negras, respectivamente.

IV.3.3. Estructura genética poblacional en la cuenca del Segura

IV.3.3.1. Diversidad genética intrapoblacional

En la cuenca del Segura se detectaron para la región D-Loop dos haplotipos nativos pertenecientes a las líneas evolutivas *Adriática-Suribérica* (**AD_{SI}1**) y *Mediterránea-Ibérica* (**ME_{MI}1**), y cuatro haplotipos correspondientes a stocks de piscifactoría (**AT_{EX}1**, **AT_{EX}2**, **AT_{EX}3** y **AT_{EX}4**), existiendo por tanto introgresión genética de material genético alóctono en el ADN mitocondrial en algunos de los ríos estudiados. Los linajes nativos fueron más abundantes que los de origen alóctono, presentando unas frecuencias del 84 y 16%, respectivamente. La distribución geográfica y las frecuencias de cada haplotipo autóctono encontrado se muestran en la Figura IV.33. Excluyendo las secuencias foráneas, el linaje *Adriático-Suribérico* presentó una frecuencia en la cuenca del 72%, mientras que la línea *Mediterránea-Ibérica* mostró una frecuencia del 28%. El linaje *Adriático-Suribérico* presentó una frecuencia alta en los ríos Segura, Madera y Zumeta, mientras que la línea *Mediterránea-Ibérica* mostró una distribución restringida, detectándose en alta frecuencia en el Tus junto con el linaje *Adriático-Suribérico*. Al analizar cada río por separado, los cursos del Segura y el Madera presentaron una composición haplotípica nativa constituida por el haplotipo **AD_{SI}1** (Figura IV.33). Por otro lado, los valores de diversidad haplotípica detectados en el río Tus fueron intermedios ($H = 0,209 \pm 0,116$), mientras que la diversidad nucleotídica mostró un valor bajo en este curso ($\pi_n = 0,001 \pm 0,001$). Finalmente, los valores de diversidades haplotípica y nucleotídica en la cuenca del Segura fueron elevados ($H = 0,407 \pm 0,054$, $\pi_n = 0,002 \pm 0,001$).

Por otro lado, el análisis de los ocho microsatélites analizados permitió identificar 57 variantes alélicas en la cuenca, detectándose 15 alelos correspondientes a stocks de piscifactoría (Anexo III). Estas formas alélicas de origen exótico mostraron una alta incidencia en los ríos analizados, con algunos alelos foráneos presentes con frecuencias alélicas superiores al 5% (Figura IV.34). Los ríos mostraron una diversidad genética inferior a la encontrada globalmente en la cuenca del Segura, aunque igualmente elevada (Tabla IV.13). Los valores de variabilidad genética variaron dependiendo del río analizado, mostrando el río Segura unos niveles ligeramente superiores al resto de cursos fluviales, mientras que el río Zumeta los mínimos encontrados. Por otro lado, 11 de los 32 análisis mostraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas. Al agrupar los loci analizados, los valores de F_{IS} fueron positivos y significativos tanto a nivel de cuenca como en los ríos Segura, Madera y Tus, sin que en el río Zumeta se detectaran diferencias significativas con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg.

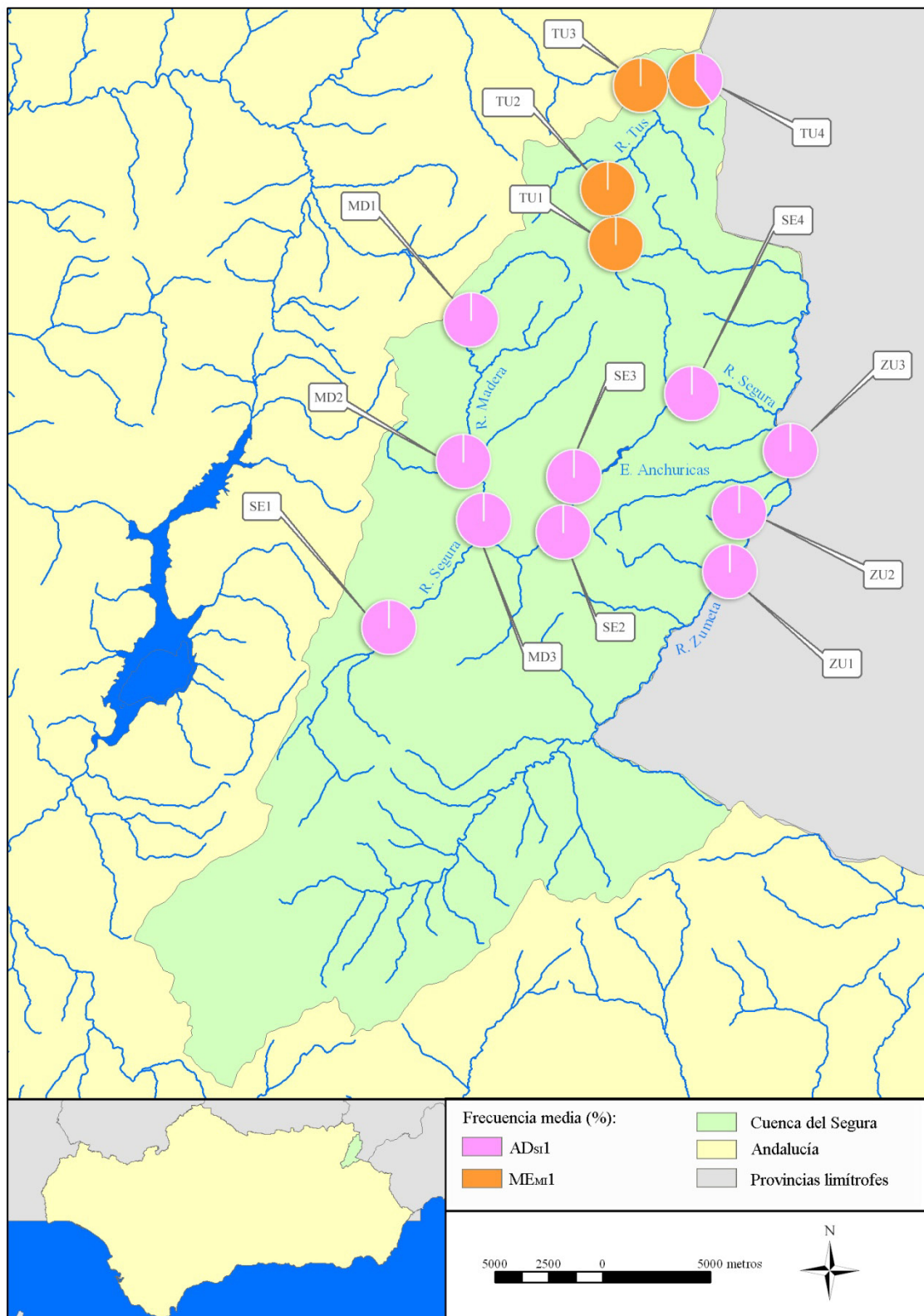


Figura IV.33. Posición geográfica y frecuencias de los diferentes haplotipos nativos de Trucha Común en la cuenca del Segura.

Los histogramas de las frecuencias alélicas mostraron diferentes patrones de distribución dependiendo del microsatélite y río analizado (Figura IV.34). Excluyendo las variantes alóctonas y aquellos alelos con frecuencias inferiores al 5%, los loci Str15, Str60, Str73, Ssa85 y BFRO 002 exhibieron en la cuenca una distribución bimodal, mientras que los microsatélites Ssa197, SSOSL417 y SSOSL438 mostraron un patrón de frecuencias multimodal. El 47% de los ríos estudiados no siguió el patrón de distribución descrito a nivel de cuenca (Figura IV.34). Al comparar los ríos estudiados, se detectaron diferencias en las variantes alélicas nativas más frecuentes en tres de los loci analizados (Figura IV.34). De esta manera, el alelo Ssa197*150 mostró una mayor frecuencia en los ríos Madera y Zumeta, mientras que las variantes *154 y *162 fueron mayoritarias en los cursos del Tus y Segura, respectivamente. En el locus SSOSL417, cada río mostró una variante mayoritaria, con la excepción del Madera y Tus que exhibieron en frecuencias similares la forma alélica *209. Dentro del río Tus no fue detectada una única variante mayoritaria, mostrando las formas alélicas SSOSL417*195 y *209 frecuencias próximas al 39%. Finalmente, el locus BFRO 002 mostró la variante *117 en alta frecuencia en el Madera, Zumeta y Tus, separando estos ríos del Segura, con una mayor frecuencia del alelo *119. Las diferencias entre las distintas formas alélicas mayoritarias fueron debidas a entre uno y cuatro saltos mutacionales. En la cuenca del Guadalfeo se detectaron siete variantes alélicas exclusivas de cuenca o río, sin que fueran encontradas en el resto de cursos fluviales. La variante Ssa85*106 presentó una distribución restringida a la cuenca del Segura, siendo detectada en todos los ríos estudiados. El alelo Str15*228 fue detectado únicamente en el Zumeta, las variantes Ssa85*102 y BFRO 002 en el Tus, las forma alélica SSOSL417*187 en el curso del Madera, mientras que los alelos SSOSL417*183 y BFRO 002*119 se asignaron de manera exclusiva al río Segura. Por otro lado, la cuenca del Segura presentó ocho alelos exclusivos y compartidos con las cuencas suribéricas estudiadas (Capítulos IV.3.1 y IV.3.2). Las variantes alélicas Str15*212, Ssa197*154 y SSOSL438*93 permitieron distinguir al río Tus en la cuenca del Segura, los alelos SSOSL417*171, *199, *205 y *207 al río Segura, mientras que las variantes SSOSL438*103 y *107 presentaron una distribución restringida a los ríos Zumeta y Madera, respectivamente.

IV. Diversidad y estructuración genética en el sur de la Península Ibérica

Tabla IV.13. Parámetros de diversidad genética poblacional estimados para la Trucha Común en los ríos analizados de la cuenca del Segura. Parámetros estimados: número de ejemplares analizados (N), número de alelos (A), riqueza alélica (A_R), alelos privados (P_A), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e) e índice de fijación (F_{IS}). Las desviaciones significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas bajo el equilibrio de H-W son indicadas por medio de asteriscos (Valores de significación: $*$ = $p < 0,05$, $**$ = $p < 0,01$, $***$ = $p < 0,001$).

		<i>Str15</i>	<i>Str60</i>	<i>Str73</i>	<i>Ssa85</i>	<i>Ssa197</i>	<i>SSOSL417</i>	<i>SSOSL438</i>	<i>BFRO 2</i>	Total
Segura	<i>N</i>	54	56	53	54	55	55	54	54	58
	<i>A</i>	4	3	3	6	7	12	3	2	5,000
	<i>A_R</i>	3,801	2,639	2,356	4,749	5,202	8,448	2,682	2,000	3,985
	<i>P_A</i>	0,282	0,242	0,075	0,377	1,350	2,243	0,047	0,254	0,610
	<i>H_o</i>	0,407	0,286	0,132	0,519	0,655	0,818	0,204	0,370	0,424
	<i>H_e</i>	0,415	0,368	0,125	0,543	0,731	0,799	0,188	0,401	0,446
	<i>F_{IS}</i>	0,027	0,231	-0,046	0,055*	0,113	-0,014	-0,076	0,086	0,059*
Madera	<i>N</i>	34	33	33	31	32	16	31	31	29
	<i>A</i>	4	3	4	4	6	8	3	2	4,250
	<i>A_R</i>	3,919	2,929	3,931	3,978	5,195	8,000	2,883	1,996	4,104
	<i>P_A</i>	0,406	0,135	0,567	0,475	0,610	1,226	0,445	0,000	0,480
	<i>H_o</i>	0,265	0,152	0,303	0,710	0,406	0,938	0,194	0,226	0,399
	<i>H_e</i>	0,471	0,291	0,498	0,693	0,584	0,787	0,258	0,200	0,473
	<i>F_{IS}</i>	0,449**	0,49**	0,405**	-0,8	0,318**	-0,160	0,264	-0,111	0,173**
Zumeta	<i>N</i>	28	28	28	28	28	27	28	28	28
	<i>A</i>	5	3	3	3	5	6	5	2	4,000
	<i>A_R</i>	4,708	2,560	2,570	3,000	3,714	5,484	4,926	2,000	3,620
	<i>P_A</i>	0,533	0,060	0,127	0,824	0,687	1,978	1,808	0,584	0,820
	<i>H_o</i>	0,393	0,214	0,214	0,571	0,571	0,556	0,714	0,393	0,453
	<i>H_e</i>	0,420	0,195	0,249	0,576	0,435	0,677	0,751	0,392	0,462
	<i>F_{IS}</i>	0,083	-0,084	0,158	0,026	-0,297*	0,198	0,067	0,017	0,037
Tus	<i>N</i>	38	40	40	38	39	31	38	37	40
	<i>A</i>	4	2	5	4	6	8	4	4	4,625
	<i>A_R</i>	3,127	1,999	4,594	3,215	4,361	6,474	3,215	3,549	3,817
	<i>P_A</i>	0,331	0,197	1,068	0,296	1,204	0,890	0,576	0,319	0,610
	<i>H_o</i>	0,158	0,1	0,275	0,29	0,615	0,742	0,132	0,108	0,302
	<i>H_e</i>	0,195	0,255	0,552	0,258	0,554	0,689	0,258	0,246	0,376
	<i>F_{IS}</i>	0,203	0,616**	0,511***	-0,107	-0,098*	-0,06	0,501*	0,570***	0,209**
Cuenca del Segura	<i>N</i>	154	157	154	151	154	129	151	150	155
	<i>A</i>	6	3	5	7	9	16	7	4	7,125
	<i>A_R</i>	5,970	3,000	5,000	6,997	8,838	16,000	6,994	3,997	7,100
	<i>P_A</i>	2,442	2,041	2,381	3,333	4,194	5,616	2,5	2,429	3,120
	<i>H_o</i>	0,312	0,198	0,221	0,510	0,578	0,760	0,278	0,280	0,392
	<i>H_e</i>	0,383	0,304	0,364	0,669	0,753	0,888	0,387	0,509	0,532
	<i>F_{IS}</i>	0,189**	0,353***	0,397***	0,241**	0,236***	0,148***	0,284***	0,452***	0,267**

IV. Diversidad y estructuración genética en el sur de la Península Ibérica

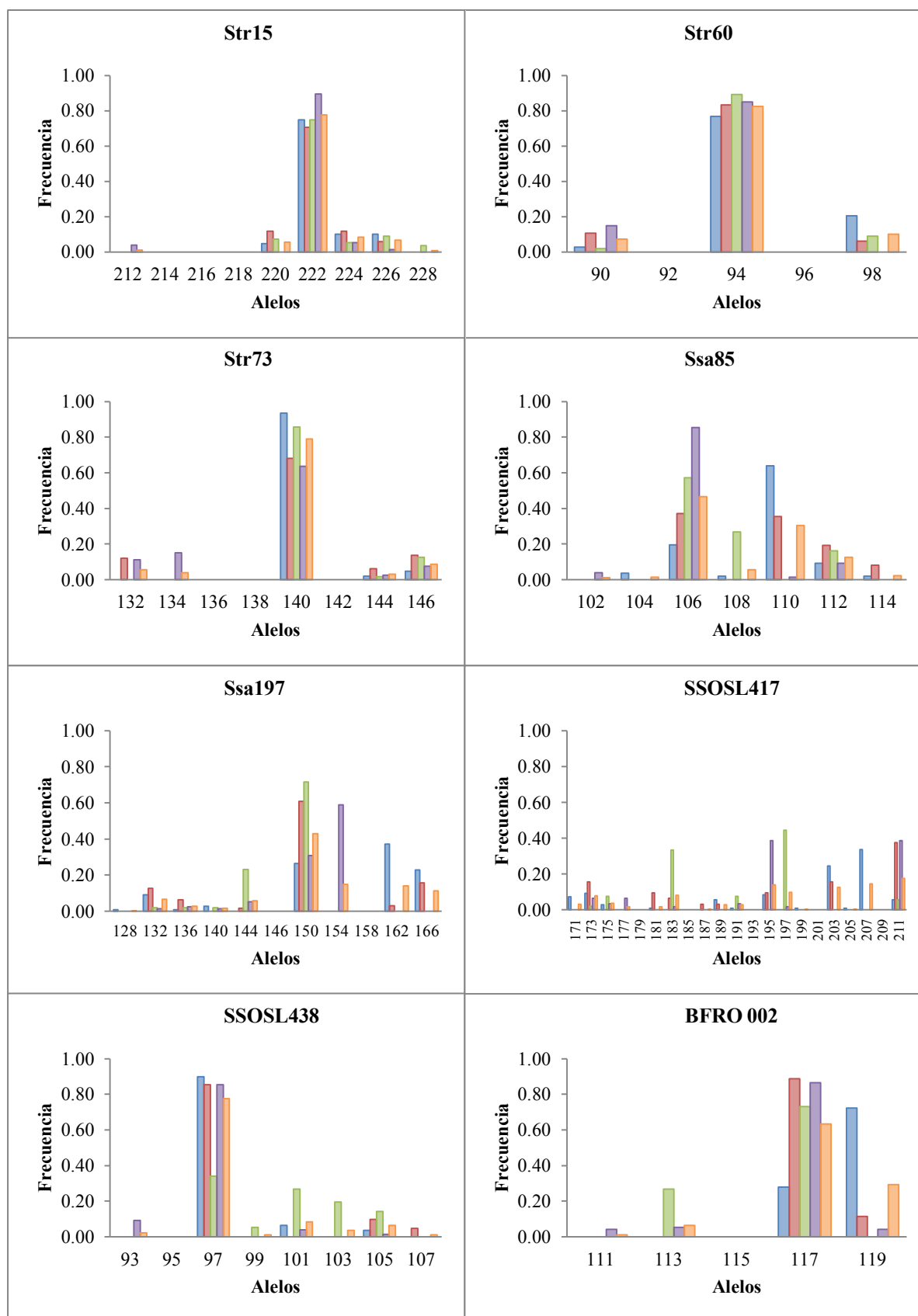


Figura IV.34. Frecuencias alélicas obtenidas para los ocho loci microsatélites analizados en los ríos Segura ■, Madera ■, Zumeta ■ y Tus ■; así como en toda la cuenca del Segura ■.

IV.3.3.2. Diversidad genética interpoblacional

IV.3.3.2.1. Diversidad genética interpoblacional mitocondrial

Los niveles de diferenciación genética entre los ríos analizados fueron muy elevados ($F_{ST} = 0,433$), oscilando el índice F_{ST} entre 0 entre los ríos Segura, Madera y Zumeta; y 0,872 en la comparación de los ríos Segura y Tus (Anexos IV). Los altos valores de F_{ST} encontrados indicaron la existencia de una alta y significativa estructura interpoblacional dentro de la cuenca del Segura, poniendo de manifiesto la ausencia de flujo génico entre las localidades situadas aguas arriba del río Tus (TU1, TU2 y TU3) y el resto de la cuenca.

Los resultados del análisis de AMOVA mostraron que el 86% de la variación genética en la cuenca fue debida a las diferencias entre ríos, mientras que el 11% puede explicarse por las divergencias intrapoblacionales existentes. El alto nivel de estructuración detectado ($\Phi_{ST} = 0,864$, $p < 0,01$) se relacionó con la variación existente entre los ríos ($\Phi_{CT} = 0,844$, $p < 0,001$), sin que se detectaran diferencias dentro de los cursos analizados ($\Phi_{SC} = 0,223$, $p > 0,05$).

La estructuración entre los ríos analizados ha sido resumida en un fenograma, contruido a partir de la matriz de distancias F_{ST} y el método de agrupamiento de distancias NJ (Figura IV.35). Las agrupaciones observadas en dicho árbol fueron apoyadas por los altos valores de F_{ST} obtenidos (Anexo IV). El fenograma muestra un primer conjunto de ríos agrupados por el haplotipo **AD_{SI}1**, incluyendo los ríos Segura, Madera y Zumeta. Por otro lado, el río Tus formaría un grupo diferenciado debido a la presencia en su curso de las secuencias nativas **AD_{SI}1** y **ME_{MI}1**. Dentro del río Tus, las localidades muestreadas más aguas arriba (TU1, TU2 y TU3) mostraron únicamente el haplotipo **ME_{MI}1**. Sin embargo, este haplotipo mostró una frecuencia menor en el tramo más aguas abajo, mostrando una frecuencia similar a la secuencia **AD_{SI}1**. De hecho, a nivel poblacional la localidad muestreada en el Pte. Ctra. Aserradero no formó un grupo diferenciado sino intermedio entre el primer grupo constituido por los ríos Segura, Madera y Zumeta; y el resto de localidades muestreadas en el Tus. Los valores de F_{ST} obtenidos no fueron significativamente distintos en la comparación de esta localidad con el resto de poblaciones muestreadas en la cuenca (Anexo IV), apoyando la estructura descrita.

Los resultados obtenidos en el análisis de PCA (Figura 4.36), fueron concordantes con el fenograma obtenido. En el análisis de PCA toda la variación encontrada fue explicada por la primera coordenada, tanto a nivel de río (100%) como de localidad (100%). Este eje separó el río Tus del resto de cursos de la cuenca del Segura, debido a la presencia del haplotipo **ME_{MI}1**.

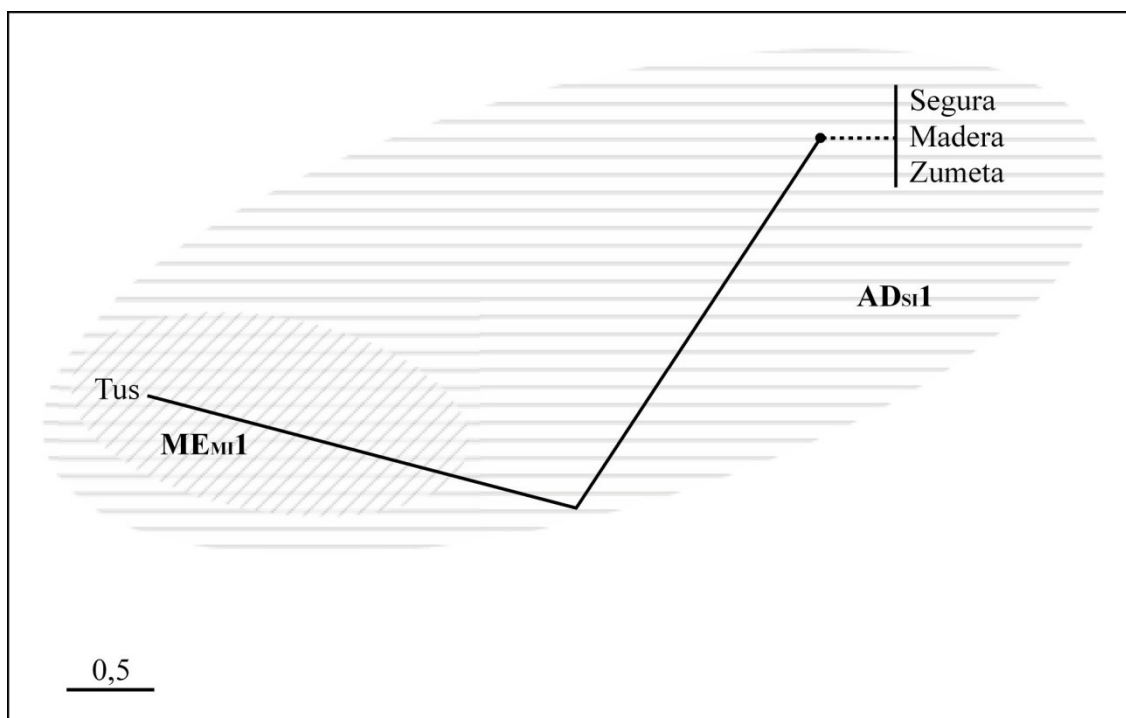


Figura IV.35. Fenograma basado en la matriz de distancias genéticas y el análisis de *NJ* para la región D-Loop entre las poblaciones analizadas de la cuenca del Segura.

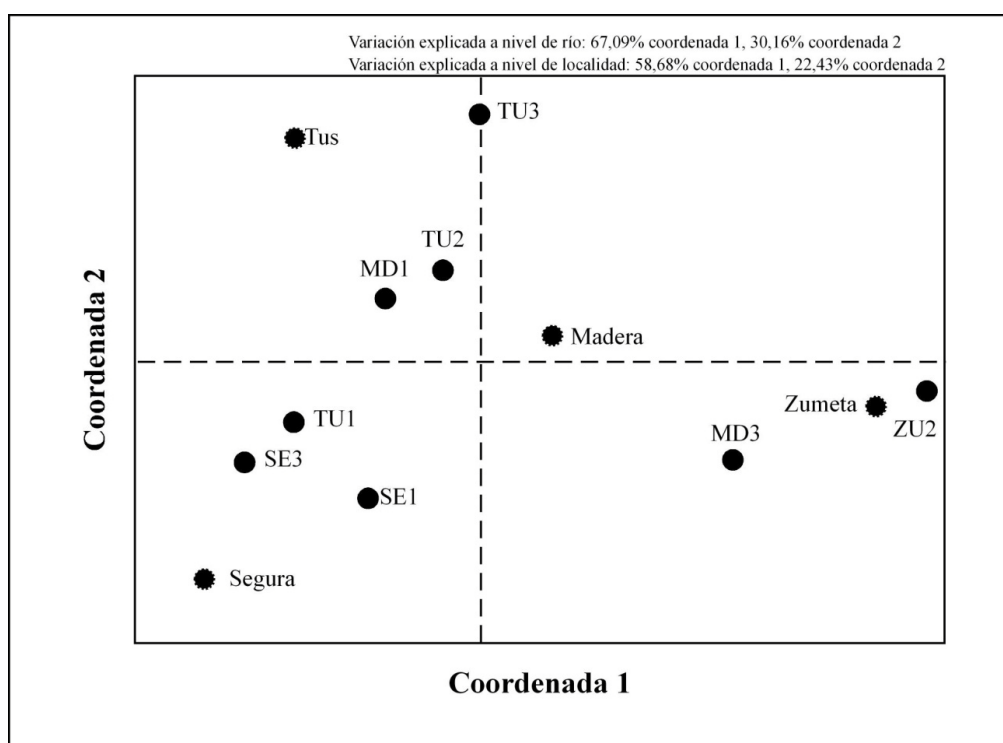


Figura IV.36. PCA basado en la matriz de distancias genéticas F_{ST} entre los ríos analizados de la cuenca del Segura.

IV.3.3.2.2. Diversidad genética interpoblacional nuclear

Los valores de diferenciación genética dentro de la cuenca del Segura fueron elevados ($R_{ST} = 0,165$). Todos los cursos comparados mostraron valores de divergencia significativos, oscilando entre 0,076 ($p < 0,01$) en los ríos Madera y Zumeta y 0,287 ($p < 0,001$) entre los ríos Segura y Zumeta (Anexo IV). Dentro de los cursos analizados, los resultados obtenidos mostraron una diferenciación elevada y significativa dentro del río Madera ($R_{ST} = 0,151$, $p < 0,01$). Por otro lado, la divergencia intrapoblacional detectada en el río Tus fue inferior, observándose una diferenciación moderada entre las localidades TU2 y TU3 ($R_{ST} = 0,093$, $p < 0,05$). Los resultados del análisis de AMOVA mostraron diferencias significativas a todos los niveles jerárquicos estudiados. El alto nivel de estructuración detectado ($\Phi_{ST} = 0,194$, $p < 0,001$) se relacionó principalmente con la variación existente entre los ríos analizados ($\Phi_{CT} = 0,118$, $p < 0,05$), y en menor medida con los patrones hidrológicos existentes dentro de los propios cursos fluviales ($\Phi_{SC} = 0,086$, $p < 0,01$). El 12% de la variación encontrada fue debida a las diferencias existentes entre los distintos ríos, mientras que el 81% lo explicaría la divergencia existente entre todas las localidades estudiadas.

Los resultados obtenidos empleando el programa *STRUCTURE* mostraron dentro de la cuenca del Segura una estructuración genética constituida por dos poblaciones parentales ($K=2$), observándose una clara dominancia de uno o varios grupos dependiendo del río analizado (Figuras IV.37 y IV.38). Según los resultados obtenidos, el río Segura formaría un grupo altamente diferenciado en la cuenca, y definido por el grupo 1. El grupo 2 sería característico del Zumeta y Tus, mientras que los ejemplares analizados en el río Madera presentaron unos porcentajes intermedios y similares entre estos dos grupos. Para poder detectar la subestructuración existente, cada río o conjunto de ríos agrupados según su población parental asignada fueron reanalizados por separado con el programa *STRUCTURE*. Los resultados obtenidos mostraron una separación entre los ríos Zumeta y Tus, observándose una estructuración genética definida por dos poblaciones parentales (Figuras IV.37 y IV.38). Los resultados obtenidos no mostraron signos de subestructuración poblacional dentro de cada río, con la excepción del Madera, que mostró poblaciones parentales diferentes en los dos tramos analizados (Figuras IV.37 y IV.38).

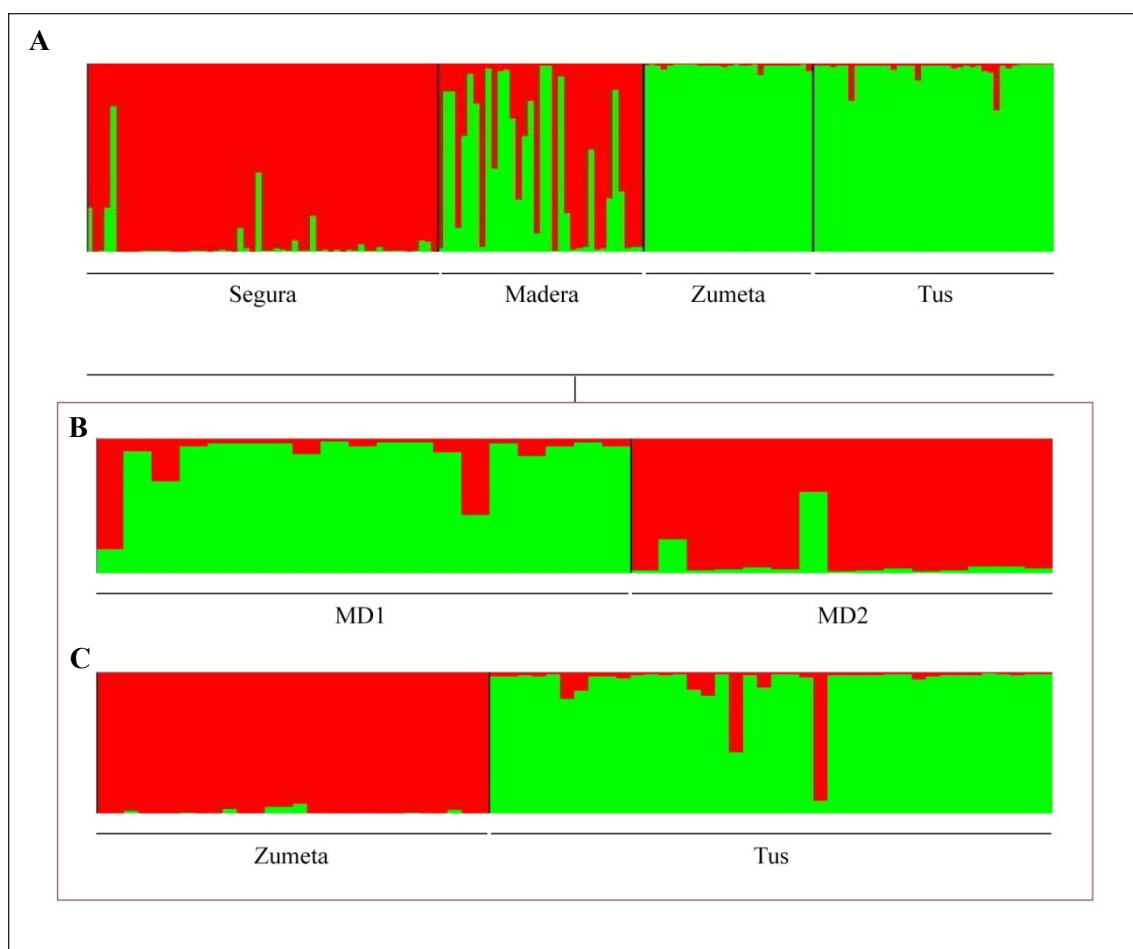


Figura IV.37. Estructura genética estimada por el programa *STRUCTURE* y validada por el test de Evanno para los ejemplares analizados en la cuenca del Segura (A) y en los ríos Madera (B), Zumeta y Tus (C).

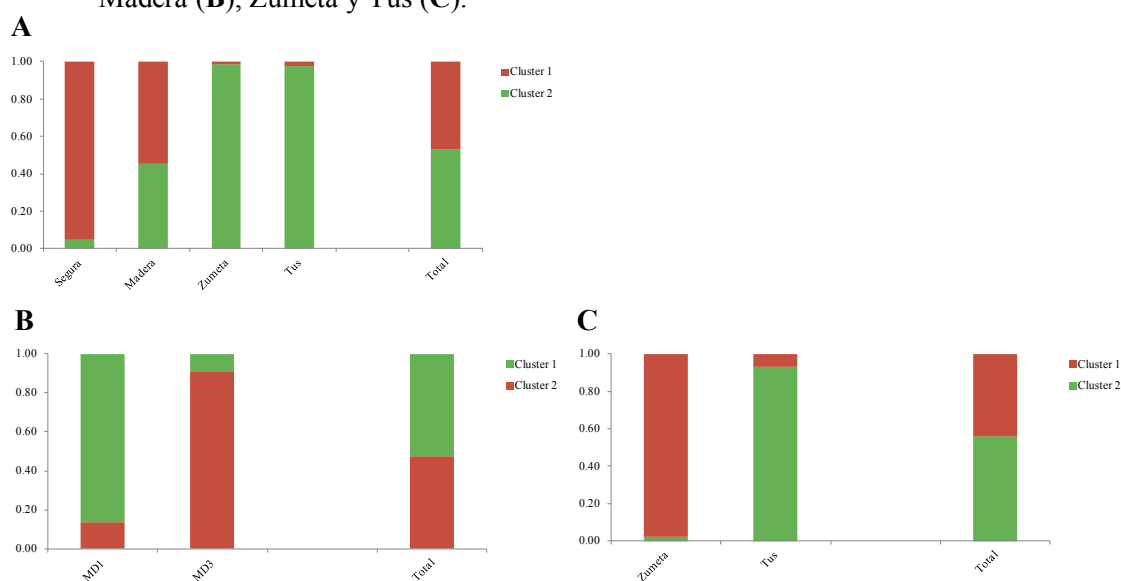


Figura IV.38. Proporción media de cada grupo en la cuenca del Segura (A), en los ríos Zumeta y Tus (B), y en las localidades estudiadas dentro del río Madera (C), así como en el total de ríos y puntos de muestreo en cada caso.

La estructuración encontrada entre los ríos de la cuenca del Segura ha sido resumida en dos fenogramas, generados a partir de las matrices de distancias genéticas D_A y D_C y el método de agrupamiento NJ (Figura IV.39). Ambas reconstrucciones mostraron topologías similares, obteniéndose unos valores de soporte muy elevados y longitudes de ramas análogas. Los ríos Segura y Madera, por un lado, y Zumeta y Tus por otro; constituyeron dos grupos altamente diferenciados, con unos valores de soporte superiores del 70%. Al analizar cada ejemplar por separado, el fenograma obtenido mostró una topología típica de árbol, exhibiendo numerosas ramificaciones a lo largo de toda su estructura (Figura IV.39). De manera general, los ejemplares estudiados presentaron un nivel de mezcla genética bajo, existiendo algunos nodos con ejemplares de distinta procedencia hidrográfica. Salvo excepciones, los ejemplares analizados en los ríos Segura, Zumeta y Tus se agruparon en diferentes ramas del fenograma según su origen geográfico. Por otro lado, las muestras del Madera no pudieron ser agrupadas a partir del mismo nodo común, distribuyéndose basalmente al resto de cursos fluviales.

Por otro lado, el análisis de PCA (Figura IV.40) muestra una alta variabilidad explicada por la primera coordenada, tanto a nivel de río (87%) como de localidad (67%). Dicho eje separó los ríos Madera y Zumeta del resto de cursos analizados en la cuenca. Estos resultados fueron determinados principalmente por la variación alélica encontrada en los loci Str15, Str60, Ssa85 y SSOSL417; presentando una variabilidad superior al 92%. Cabe destacar que la alta diferenciación observada dentro del Madera fue también detectada en este análisis, situándose sus dos localidades a uno y otro lado del origen. La segunda coordenada del análisis agrupó en el mismo lado del eje por un lado a los Tus y Madera, y por otro a los ríos Segura y Zumeta. Los ríos se distribuyeron principalmente debido a la variabilidad en las frecuencias alélicas de los loci Ssa197 y BFRO 002; mostrando una variación superior al 27%. Este eje destacó la diferenciación existente dentro de los ríos Madera y Tus, situándose sus localidades a ambos lados del origen de coordenadas.

IV.3.3.3. Aislamiento poblacional por distancia

Los resultados obtenidos en el test de Mantel no mostraron la existencia de una correlación significativa entre las distancias genéticas y geográficas dentro de la cuenca del Segura, ni a nivel mitocondrial ($r = 0,974$, $p > 0,05$) ni nuclear ($r = -0,149$, $p > 0,05$).

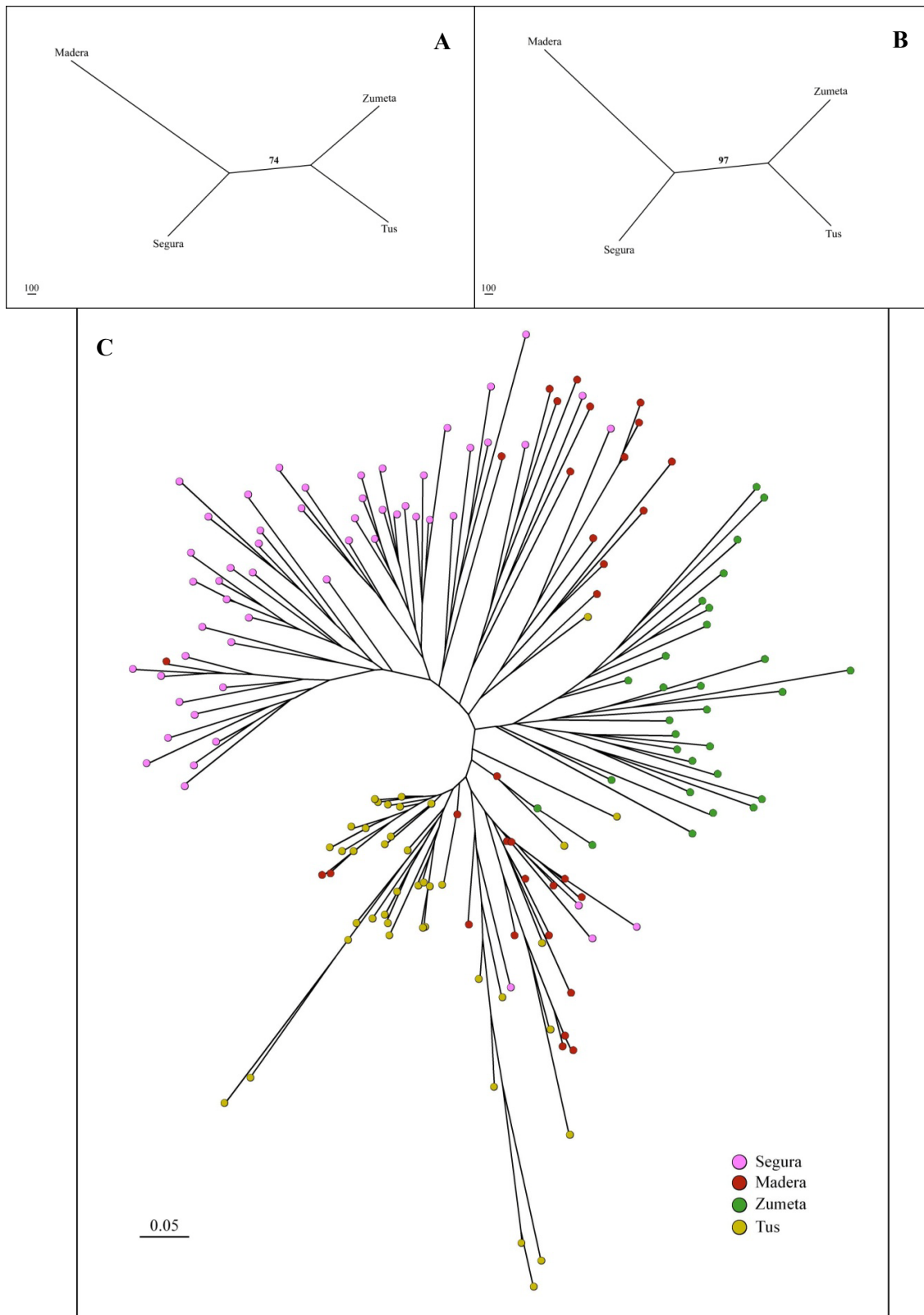


Figura IV.39. Fenogramas basados en el análisis de *NJ* a partir de las matrices de distancias genéticas de Nei (A) y de Cavalli-Sforza (B) entre los ríos de la cuenca del Segura, así como entre todos ejemplares analizados (C) empleando la matriz de distancias genéticas de Cavalli-Sforza. Los valores de *bootstrap* superiores a 60 para (A) y (B) se indican en las ramas de cada árbol.

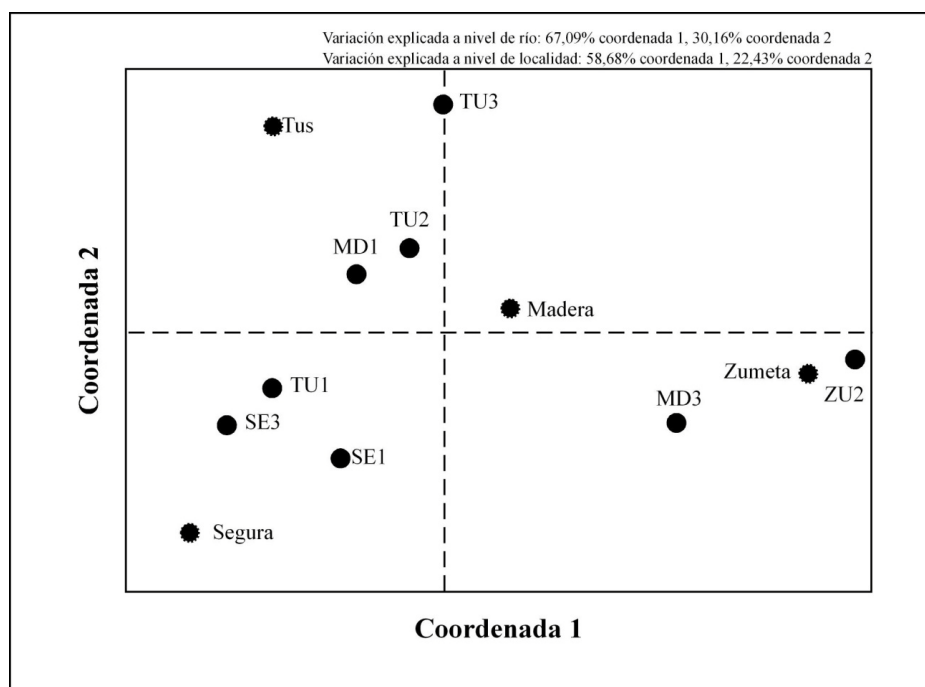


Figura IV.40. PCA basado en la matriz de distancias genéticas R_{ST} entre los ríos analizados de la cuenca del Segura.

IV.3.3.4. Historia demográfica

Se contrastaron los procesos demográficos recientes tanto a nivel de cuenca como dentro de cada río analizado. Los ríos Segura, Madera y Zumeta mostraron un único haplotipo mitocondrial en sus cursos. Este hecho incumple las premisas de los modelos y test empleados, por lo que no pudieron ser estimados en estos casos los estadísticos de neutralidad y la distribución de diferencias genéticas entre pares de poblaciones.

Los valores de los estadísticos D de Tajima, F^* y D^* de Fu y Li, y F_S de Fu no se desviaron significativamente del modelo de neutralidad de Wright–Fisher, no detectando así ninguna fuerza evolutiva o demográfica sobre las poblaciones comparadas (Tabla IV.14)

El análisis de los resultados de la distribución *Mismatch* tanto en el río Tus como en toda en la cuenca del Segura (Tabla IV.14) no permitió inferir ningún acontecimiento de expansión demográfica ($P_{SSD} < 0,05$, $r = 0,713$ y $P_{SSD} < 0,05$, $r = 0,683$, respectivamente), presentando una distribución entre pares de poblaciones bimodal que es consistente con una estabilidad poblacional (Figura IV.41).

Tabla IV.14. Pruebas de neutralidad y parámetros demográficos estimados por el análisis de *Mismatch* bajo un modelo de expansión repentina en la cuenca del Segura. Parámetros demográficos: (τ) edad de expansión en unidades de tiempo mutacional, (θ_0) tamaño poblacional antes, y (θ_1) después de la expansión, (P_{SSD}) probabilidad de observar al azar un ajuste entre la distribución mismatch observada y esperada, (r) índice *Raggedness*. Los intervalos de confianza son incluidos entre paréntesis. Valores de significación: * = $p < 0,05$.

Parámetros	Tus	Cuenca del Segura
D de Tajima	-0,888 n.s.	2,073 n.s.
F^* de Fu	0,720 n.s.	1,636 n.s.
D^* de Fu y Li	1,199 n.s.	1,084 n.s.
F_s de Fu	2,953 n.s.	7,547 n.s.
τ	3,000 (0-3,500)	3,000 (0-5,139)
θ_0	0 (0-0,007)	0 (0-0,217)
θ_1	0,142 (0-99999)	0,433 (0-99999)
P_{SSD}	0,017	0,020
r	0,713	0,683

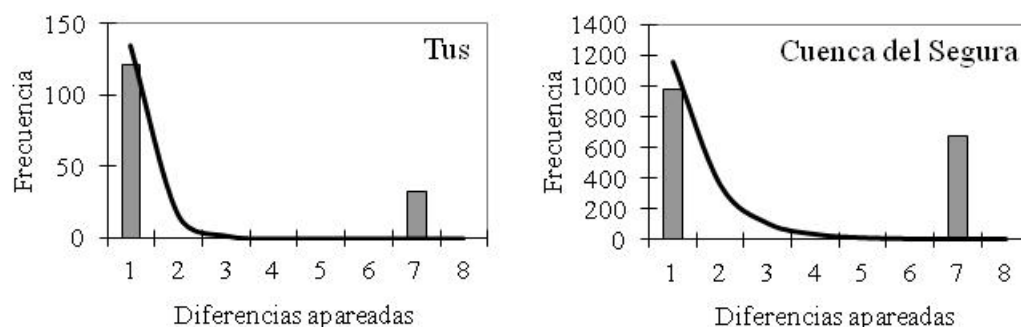


Figura IV.41. Distribuciones *Mismatch* en la cuenca del Segura. Las barras verticales muestran la distribución de las diferencias observadas y la línea continua la distribución esperada bajo un modelo de expansión repentina de Roger (1995) y modificada por Schneider y Excoffier (1999).

Utilizando un modelo de mutación TPM y comparando los resultados obtenidos con el test de Wilcoxon, solo la localidad situada en el Cortijo Arrancapechos del río Madera mostró signos de cuello de botella reciente, con un exceso significativo de heterocigosis en los loci analizados (Tabla IV.15). Los valores de significación obtenidos bajo el modelo SMM fueron más conservados, sin que se detectara un exceso de heterocigosis en las poblaciones estudiadas. Por otro lado, todos los ríos analizados mostraron un déficit de heterocigotos significativo (Tabla IV.15), siendo confirmados estos resultados por los dos modelos empleados en la cabecera del Segura y en el río Tus. Asimismo, se obtuvo un resultado similar al emplear el modelo SMM a nivel de cuenca, mostrando un valor significativo de déficit de heterocigotos.

Tabla IV.15. Valores de significación estimados (p) en el análisis de fenómenos de cuello de botella en la cuenca del Segura bajo los modelos de mutación por pasos (SMM) y mutación en dos pasos (TPM) con una proporción de SMM del 70% para un exceso ($H_e > H_{eq}$) y déficit ($H_e < H_{eq}$) de heterocigosis. Los valores de p significativos ($p < 0,05$) son incluidos en negrita.

Cuenca	Río	Localidad	TPM		SMM	
			$p (H_e > H_{eq})$	$p (H_e < H_{eq})$	$p (H_e > H_{eq})$	$p (H_e < H_{eq})$
Segura	Segura	SE1	0,981	0,027	0,998	0,004
Segura	Segura	SE3	0,531	0,531	0,961	0,055
Segura	Segura		0,902	0,125	0,994	0,010
Segura	Madera	MD1	0,953	0,078	0,953	0,078
Segura	Madera	MD3	0,004	0,998	0,156	0,875
Segura	Madera		0,902	0,125	0,990	0,014
Segura	Zumeta	ZU2	0,844	0,191	0,963	0,037
Segura	Tus	TU1	-	-	-	-
Segura	Tus	TU2	0,500	0,594	0,688	0,406
Segura	Tus	TU3	0,981	0,027	0,996	0,006
Segura	Tus		0,998	0,004	0,998	0,004

IV.3.3.5. Migración y tamaño efectivo poblacional

Dentro de la cuenca del Segura el estudio genético empleando el programa *MIGRATE-N* mostró un nivel de flujo entre las localidades ($M = 0,990$) y ríos ($M = 1,068$) analizados muy pequeño, oscilando la tasa de migración entre 0,018 y 2,736 (Anexo V). Los ríos Madera y Tus no presentaron barreras físicas naturales o artificiales que impidieran la conexión entre sus localidades, por lo que el valor mínimo de M obtenido entre las localidades TU3 y TU2 ($M = 1,027$) fue empleado como referencia de la mínima migración “potencial” existente dentro de la cuenca. En el conjunto de localidades analizadas el flujo genético fue limitado ($M < 1$), detectándose una migración preferentemente asimétrica entre las localidades más próximas geográficamente (Figura IV.42). La proporción del número de inmigrantes de primera generación fue igualmente baja (2,5%), obteniéndose una tasa de inmigración media de 0,025.

El tamaño efectivo poblacional estimado en la cuenca fue bajo (23,7), oscilando entre 4,3 ejemplares en el río Madera y un valor estimado como “infinito” en el Zumeta (Tabla IV.16). Todos los niveles estudiados presentaron valores de N_e inferiores a 30 individuos, con la excepción del Zumeta, con un tamaño efectivo poblacional muy grande o “infinito”.

Tabla IV.16. Tamaño efectivo poblacional (N_e) en los ríos y localidades analizados en la cuenca del Segura. El intervalo de confianza al 95% asociado (C.I.) se indica entre paréntesis.

Cuenca	Río	Localidad	N_e (C.I. 95.%)
Segura	Segura	SE1	23,3 (15,8-65,2)
Segura	Segura	SE3	21,5 (14,3-36,6)
Segura	Segura		25,3 (19,7-33,4)
Segura	Madera	MD1	11,3 (5,4-39,3)
Segura	Madera	MD3	12,1 (8,0-21,3)
Segura	Madera		4,3 (3,5-5,2)
Segura	Zumeta	ZU2	∞ (66,2- ∞)
Segura	Tus	TU1	-
Segura	Tus	TU2	8,2 (2,8- ∞)
Segura	Tus	TU3	6,8 (5,5-8,5)
Segura	Tus		8,1 (6,7-9,9)
Segura			23,7 (21,2-26,6)

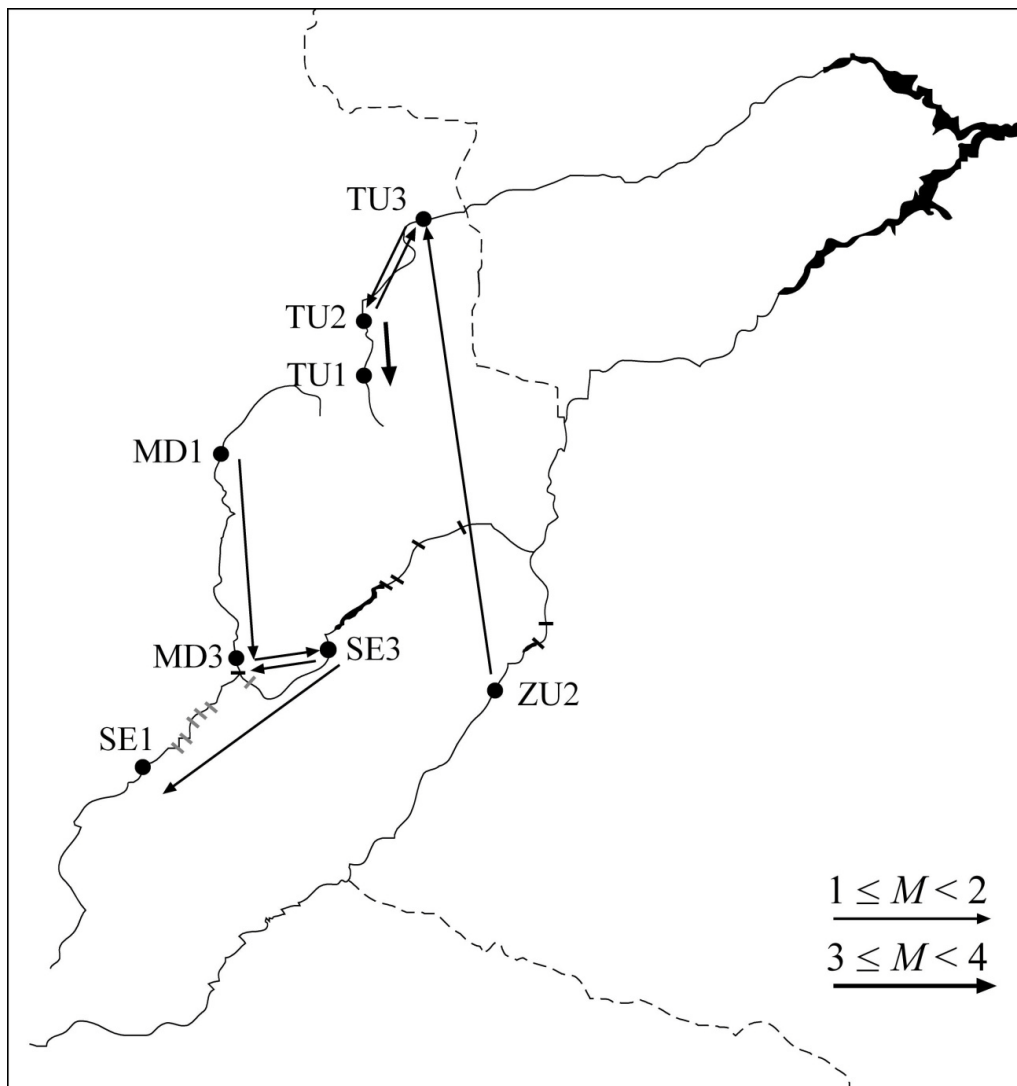


Figura IV.42. Tasa de migración (M) estimada entre las localidades y ríos estudiados en la cuenca del Segura. La dirección y fuerza de migración se representa mediante flechas. No son mostrados valores de $M < 1$. Las barreras infranqueables naturales y artificiales se indican en el mapa empleando barras grises y negras, respectivamente.

IV.4. DISCUSIÓN

IV.4.1. Incidencia de las repoblaciones

Las repoblaciones con ejemplares alóctonos generan modificaciones en la distribución de la diversidad genética tanto dentro, como entre las poblaciones autóctonas (Sønstebo *et al.* 2008b, Hansen 2002, Hansen *et al.* 2009, Perrier *et al.* 2013), disminuyendo los niveles originales de diferenciación y aislamiento poblacional (Allendorf *et al.* 2001, Sanz *et al.* 2002, Eldridge y Naish 2007, Marie *et al.* 2010, Perrier *et al.* 2013). Por ello, la identificación y exclusión de estos ejemplares de los análisis permite la identificación de la estructura genética nativa aún presente, reduciendo el impacto de la hibridación sobre los datos analizados (Campton y Johnston 1985, Poteaux *et al.* 1999, Hansen *et al.* 2009, Marie *et al.* 2010).

De los ejemplares analizados, el 89 y 77% mostraron haplotipos mitocondriales y genotipos nucleares autóctonos, respectivamente. De esta manera, la presencia de secuencias foráneas y los altos niveles de introgresión encontrados a nivel nuclear en algunos ríos corroboran la alta introgresión genética detectada previamente empleando el locus diagnóstico *LDH-CI** (Capítulo III). En los ríos Guadalquivir I, Guardal, Grande de Bérchules, Chico de Soportújar, Torrente, Segura y Tus se encontraron unos valores de variabilidad genética nuclear superiores a los observados en otros cursos vecinos dentro de sus respectivas cuencas. Estos ríos mostraron unos niveles de introgresión genética altos o severos (Capítulo III), detectándose en cuatro de ellos haplotipos mitocondriales exóticos. Por lo tanto, en estos cursos fluviales, el aumento de variabilidad genética podría haberse producido por la introducción de alelos de origen alóctono. En poblaciones mediterráneas y atlánticas de Trucha Común se han descrito resultados similares (Poteaux *et al.* 1999, Hansen *et al.* 2000, 2002, Heggenes *et al.* 2002, Kohout *et al.* 2012). En concreto, Berrebi *et al.* (2000) encontraron una relación significativa entre el grado de introgresión de genes exógenos en las poblaciones y la heterocigosis. Dentro de la Península Ibérica, en un estudio realizado por Almodóvar *et al.* (2006) en 307 poblaciones se observó que los parámetros de variabilidad genética intrapoblacional fueron significativamente mayores en las poblaciones con introgresión. Es más, el nivel de introgresión genética nuclear se relacionó de manera positiva y significativa con la heterocigosis esperada, la proporción de alelos polimórficos y el número medio de alelos en las cuencas del Tajo, Duero y cuencas mediterráneas. Además, en las líneas de piscifactoría usadas para repoblar se han ido incorporando genes de otras poblaciones, hecho que probablemente ha ayudado a mantener una variabilidad genética mayor. Sin embargo, la introducción de dichos genes alóctonos conlleva también una pérdida de alelos autóctonos y, por tanto, una reducción de la diversidad genética de las poblaciones naturales e incluso la pérdida de combinaciones genéticas únicas, que pueden finalmente implicar una menor adaptación a las condiciones ambientales locales. Como ejemplo, García-Marín *et al.* (1999) estimaron en la cuenca del Ebro, en la zona de Pirineos, que aproximadamente un 5% de los alelos nativos se perdía cada año como consecuencia de los cruzamientos con las truchas nativas, a pesar del bajo éxito reproductor de las truchas de repoblación. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Arias *et al.* (1995), que estimaron una tasa de pérdida del 5,5% al año en Galicia y los observados por Blanco *et al.* (1998) en la

cuenca del Ebro en Pirineos, donde la cifra alcanzó un 5,6% al año. A pesar del gran esfuerzo de repoblación con ejemplares alóctonos en el siglo pasado, los niveles de diversidad genética nativa no han sido totalmente eliminados en el área estudiada, permitiendo la detección de unidades genéticas altamente diferenciadas para la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica.

La presencia de ejemplares híbridos dificulta la conservación y recuperación de las especies (Allendorf *et al.* 2001). Este hecho es más grave en las poblaciones analizadas, donde los genes alóctonos se encuentran totalmente integrados en las poblaciones naturales, mostrando un acervo genético híbrido entre trucha autóctona y alóctona. En el presente estudio 15 localidades no mostraron indicios de introgresión genética con ninguno de los marcadores utilizados. Por tanto, estos tramos serían indicativos de la diversidad genética presente en las poblaciones mediterráneas antes del inicio de las repoblaciones. No obstante, cabe destacar que el número de ejemplares estudiados en el 41% de estas localidades fue muy bajo ($N < 10$), por lo que no se puede descartar del todo la presencia de truchas con genes alóctonos procedentes de repoblación. Aunque ninguno de los marcadores empleados mostraron introgresión de genotipos alóctonos en el 59% de las localidades restantes, no debe descartarse el hecho de que haya habido introgresión en el pasado (Allendorf *et al.* 2001). Aún así, la implantación de medidas de protección y recuperación de estas poblaciones deberían ser medidas prioritarias para la recuperación de la especie en el sur de la Península Ibérica, al fin de evitar un mayor deterioro de la integridad genética. En estos casos, las barreras infranqueables presentes han protegido a estas poblaciones de ser colonizadas por truchas alóctonas o híbridas próximas (Rahel 2013), por lo que sería desaconsejable restaurar la conectividad previa existente. El resto de poblaciones híbridas pueden contener variantes alélicas nativas o adaptaciones locales no presentes en otras localidades (Allendorf *et al.* 2001), por lo que sería necesario el seguimiento temporal de la introgresión genética, junto con la recuperación del hábitat.

IV.4.2. Diversidad genética intrapoblacional

Los niveles de diversidad genética mitocondrial y nuclear en el sur de la Península Ibérica fueron elevados (Apartados IV.3.1.1., IV.3.2.1. y IV.3.3.1), situándose dentro del rango descrito para la especie en poblaciones europeas e ibéricas (entre otros: Apostolidis *et al.* 1997, Cagigas *et al.* 1999, Poteaux *et al.* 1999, Aurelle y Berrebi 2001, Weiss *et al.* 2001, Hansen *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004, Sønstebø *et al.* 2007, Horreo *et al.* 2011, Lecerteau-Kölher *et al.* 2013, Vera *et al.* 2013). Las diferencias a nivel nuclear con otras poblaciones atlánticas (Poteaux *et al.* 1999, Heggenes *et al.* 2002, Corujo *et al.* 2004, Ayllón *et al.* 2006, Heggenes y Røed 2006) y mediterráneas (Vera 2006) pueden atribuirse a los diferentes loci empleados (Fernández 2011).

La variabilidad genética mitocondrial observada no se distribuyó de manera homogénea, encontrando desde poblaciones completamente monomórficas hasta otras con valores elevados. A pesar de que a nivel global los valores de diversidad genética fueron elevados, el 83% de los ríos exhibieron un único haplotipo mitocondrial. Por ejemplo, las cuencas del Alto Guadalquivir y el Guadiana Menor mostraron unos valores de diversidad muy

inferiores al resto de cuencas estudiadas, detectándose un único haplotipo común en todos los cursos fluviales. Sin embargo, a nivel de toda la gran cuenca del Guadalquivir los valores de diversidad genética mitocondrial fueron los más altos encontrados en el sur de la Península Ibérica. El ADN mitocondrial no experimenta recombinación genética, por lo que la selección, ya sea positiva o negativa, afectará a las frecuencias alélicas observadas produciéndose una pérdida de genotipos por un efecto barrido. Además, el genoma mitocondrial presenta un modelo de herencia materna, con un tamaño efectivo poblacional cuatro veces inferior al detectado en loci nucleares, por lo que los procesos estocásticos como la deriva genética, efecto fundador o cuellos de botella afectan en mayor medida a las poblaciones, en especial a aquellas de pequeño tamaño (Avice 2004). Este hecho podría explicar la presencia de un único haplotipo en las cuencas del Alto Guadalquivir y Guadiana Menor, y la dotación homogénea encontrada a nivel de río en el resto de cuencas suribéricas. Además, esta última característica, junto con la elevada tasa de mutación del ADN mitocondrial, explicaría la alta variabilidad encontrada, eliminándose más rápidamente los polimorfismos ancestrales presentes a nivel inter e intrapoblacional.

Los loci microsatélites mostraron una diversidad genética muy superior a la detectada tanto con el análisis de la región control en esta Tesis, como la observada en la misma área de estudio en trabajos previos (Machordom *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001, Presa *et al.* 2002, Sanz *et al.* 2002, 2006, Cortey *et al.* 2004, presente Tesis). La elevada tasa de mutación de estos marcadores explicaría los mayores niveles de diversidad intrapoblacional detectados (Estoup *et al.* 1998). Este hecho ha permitido analizar con más detalle la variabilidad y estructuración genética existente en el sur de la Península Ibérica, siendo unos marcadores idóneos para realizar análisis genéticos a partir de muestreos no invasivos de las poblaciones naturales. A nivel de cuenca, el Alto Guadalquivir presentó los niveles de diversidad intrapoblacional más bajos ($A = 4,880$, $A_R = 4,838$, $H_e = 0,401$), apoyando los bajos niveles de diversidad obtenidos con la región control. Considerando los resultados mitocondriales previos, se esperaría un resultado similar en la cuenca del Guadiana Menor. Sin embargo, dicha cuenca mostró un nivel de diversidad nuclear superior al encontrado en el Alto Guadalquivir, y similar al resto de cuencas suribéricas ($A = 6,625$, $A_R = 6,240$, $H_e = 0,543$). Las altas tasas de mutación y la naturaleza codominante de los loci microsatélites proporcionan una mayor resolución para distinguir genealogías recientes. Esta característica, sumada a su mayor tamaño efectivo poblacional, explicaría las diferencias de diversidad encontradas entre los marcadores en el Guadiana Menor ya que, al ser los loci microsatélites menos sensibles a la deriva genética y cuellos de botella que los marcadores mitocondriales, permiten detectar variabilidad incluso en organismos donde no se hayan detectado polimorfismos con otros marcadores genéticos. Además, a pesar de haber sido previamente excluidos de los análisis, es posible que las poblaciones de esta cuenca muestren aún alelos de origen alóctono, explicando los elevados valores de diversidad genética observados (Almodóvar *et al.* 2006). La cuenca del Genil presentó los menores niveles de heterocigosis observada detectados en el sur de la Península Ibérica ($H_o = 0,243$). La causa de esta menor variabilidad podría ser la presencia de poblaciones relativamente aisladas, siendo probable que las poblaciones situadas en la cabecera de los ríos sufran limitaciones en el flujo genético con el resto de la cuenca. De hecho, los valores de

diversidad fueron especialmente bajos en los ríos Monachil y Dílar, detectándose cuatro y seis loci, respectivamente, fijados para una única variante alélica. Estos resultados indican un proceso de aislamiento poblacional y deriva genética en estos cursos, que ha influido en la consiguiente pérdida de diversidad intrapoblacional. En estudios previos con alozimas se encontraron niveles reducidos de variabilidad genética en poblaciones de tamaño reducido situadas en las cabeceras de ríos con un importante grado de aislamiento, hecho que acentúa los efectos de la deriva genética, imposibilitando la migración entre cuencas y produciendo finalmente una pérdida de diversidad genética (Arias 1996, Berrebi *et al.* 2000). Del mismo modo, algunos autores atribuyen la baja heterocigosis encontrada en cuencas mediterráneas a las fluctuaciones en el tamaño poblacional debidas a la inestabilidad de las cuencas del sur de Europa (Apostolidis *et al.* 1996). Asimismo, se ha observado una variabilidad genética baja en poblaciones sometidas a acciones antropogénicas como la construcción de presas, que producen fragmentación y aislamiento de las poblaciones (Largiadèr y Scholl 1996). Otro factor que puede contribuir a esta menor variabilidad es el mayor grado de aislamiento que tienen las poblaciones de Trucha Común residentes en comparación con las anádromas, que probablemente contribuye a la disminución de la diversidad genética por pérdida de flujo genético entre poblaciones (Bouza *et al.* 1999).

Salvo excepciones, los valores de diversidad a nivel de cuenca fueron superiores a los detectados dentro de cada río, aunque estos valores no se distribuyeron homogéneamente entre las poblaciones. Además, el 92,5% de los loci mostraron desviaciones significativas del equilibrio H-W, disminuyendo este porcentaje al 21% al comparar cada río de forma aislada. Por tanto, la alta diversidad observada en las cuencas de estudio parece ser generada por la presencia de dos o más subpoblaciones diferenciadas. De hecho, la presencia de varias poblaciones aisladas y altamente separadas genéticamente explicaría tanto los niveles de heterocigosis como el elevado número de alelos por locus detectado en la cuenca del Genil (6,126), siendo superado únicamente por la cuenca del Guadalfeo debido a su elevado número de alelos exclusivos. A nivel de río, el criterio de selección de muestras empleado no excluye totalmente la presencia de alelos foráneos, siendo ésta probablemente la causa de los desequilibrios encontrados en los ríos Guadalquivir I, Aguascebas, Grande de Bérchules y Segura. Sin embargo, las desviaciones encontradas en el resto de cursos fluviales parecieron ser generadas por la presencia de varias poblaciones aisladas, tal y como se ha observado a nivel de cuenca. De igual forma, se encontró una elevada diversidad intrapoblacional al comparar las distribuciones de frecuencias alélicas obtenidas, observándose patrones de distribución distintos y/o la presencia de alelos exclusivos dependiendo del río de estudio. Resultados similares han sido observados en la Península Ibérica (Sanz *et al.* 2002, 2011, Araguas *et al.* 2004, Cortey *et al.* 2004; Vera 2006, Vera *et al.* 2010b, Fernández-Cebrián 2011) y en otras poblaciones mediterráneas sureuropeas (Estoup *et al.* 1998a; Poteaux *et al.* 1999; Antunes *et al.* 2006; Vera 2006; Martínez *et al.* 2007; Apostolidis *et al.* 2008a). En general, los alelos más frecuentes de cada microsatélite ocuparon posiciones centrales dentro de la distribución, coincidiendo con un tamaño intermedio dentro de su rango alélico, mientras que los tamaños mínimos y máximos, observados en menores frecuencias, se situaron en los extremos. Asumiendo que los microsatélites estudiados se ajustan a un modelo SMM, un cambio o salto mutacional implicaría

la pérdida o ganancia de una unidad de repetición, por lo que se obtendría un histograma de frecuencias alélicas unimodal, y esta variación podría ser explicada por una mutación al azar. Por tanto, el resultado de patrones multimodales producidos por dos o más alelos en alta frecuencia (mayor del 5%) y separados por más de un cambio mutacional, será con mayor probabilidad consecuencia de procesos evolutivos como la migración y deriva que de una mutación espontánea. La zona analizada se encuentra próxima al límite meridional de la distribución geográfica de la Trucha Común, donde las condiciones ambientales son muy restrictivas según los requerimientos de la especie. Estas poblaciones periféricas presentan generalmente densidades poblacionales bajas, por lo que las consecuencias de la deriva genética, de cuellos de botella y del efecto fundador (Sanz *et al.* 2002, Vera 2006, Vera *et al.* 2013), así como de las políticas de gestión y las características ambientales (Antunes *et al.* 2006, Campos *et al.* 2006) podrían explicar las diferencias observadas entre los distintos cursos fluviales.

IV.4.3. Estructura genética poblacional

Los niveles de diferenciación genética observados en el sur de la Península Ibérica mostraron una elevada divergencia poblacional entre cuencas, ríos y algunas localidades de muestreo (Apartados IV.3.1.2., IV.3.2.2. y IV.3.3.2), variando los índices F_{ST} y R_{ST} dependiendo de la población comparada. La Trucha Común presenta una elevada estructuración tanto a nivel macro como microgeográfico (Ferguson 1989). De hecho, esta alta diferenciación ha sido observada tanto en grandes cuencas hidrográficas (entre otros: Antunes *et al.* 1999, Bouza *et al.* 2001, Kohout *et al.* 2013), como en poblaciones próximas separadas o no por barreras infranqueables (Estoup *et al.* 1998, Carlsson y Nilsson 2000, Sanz *et al.* 2002, Heggenes y Røed 2006, Pujolar *et al.* 2011, Horreo *et al.* 2011, Stelkens *et al.* 2012). Los resultados obtenidos se sitúan dentro del rango descrito para la especie en poblaciones ibéricas y mediterráneas (entre otros: Cortey *et al.* 2004, Vera 2006, Martínez *et al.* 2007, Apostolidis *et al.* 2008b, Baric *et al.* 2010, Vilas *et al.* 2010, Horreo *et al.* 2011, Fernández-Cebrián 2011, Kohout *et al.* 2012, Vera *et al.* 2013), siendo superiores a los observados en truchas atlánticas (entre otros: Estoup *et al.* 1998, Hansen *et al.* 2000a 2002, Hansen 2002, Aurelle y Berrebi 2001, Ruzzante *et al.* 2001, Heggenes *et al.* 2002, Østergaard *et al.* 2003, Jensen *et al.* 2005, McKeown *et al.* 2010, Kohout *et al.* 2012) donde el cruce de las poblaciones residentes y anádromas conlleva a una homogeneización y, por tanto, una reducción de la diferenciación genética entre ellas (Bouza *et al.* 1999, Ruzzante *et al.* 2001, Hansen *et al.* 2002). En aquellas poblaciones que presentaron más de un haplotipo para la región control, los valores de diferenciación mitocondrial (F_{ST}) fueron superiores a las estimas obtenidas a partir de los loci microsatélites (R_{ST}). Este resultado es el esperado, ya que los loci nucleares presentan un tamaño efectivo cuatro veces superior a los loci heredados uniparentalmente, y probablemente reflejan una menor intensidad de la deriva genética en las poblaciones.

Salvo excepciones, las cuencas suribéricas revelaron un nivel de estructuración genética muy elevado (rango F_{ST} = 0-0,762, rango R_{ST} = 0,117-0,487), sugiriendo un flujo de genes restringido tanto a nivel intra como interpoblacional. La cuenca del Genil presentó uno de los

valores de diferenciación más altos descritos para la especie ($F_{ST} = 0,762$, $R_{ST} = 0,487$), únicamente superado por poblaciones residentes del Sella (Campos *et al.* 2006) y por poblaciones en declive del noreste ibérico (Antunes *et al.* 2006), Península Balcánica (Apostolidis *et al.* 2008b, 2011) e Irán (Hashemzadeh *et al.* 2012). Por otro lado, el Alto Guadalquivir mostró los niveles más bajos de diferenciación encontrados ($F_{ST} = 0$, $R_{ST} = 0,117$), próximos a los descritos a nivel nuclear en algunas poblaciones ibéricas (Ayllón *et al.* 2006, Sanz *et al.* 2011), francesas (Poteaux *et al.* 1999) y noreuropeas (Hansen *et al.* 2000a, Sønstebo 2007, Sønstebo *et al.* 2007, Östergren y Nilsson 2012).

La variabilidad genética de la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica es poco conocida, existiendo actualmente escasos estudios, centrados principalmente en el análisis general de la introgresión genética y de la estructura poblacional global de toda el área mediterránea. Los trabajos iniciales realizados en estos cursos mostraron una distribución haplotípica homogénea dentro de cada cuenca, sin detectar la existencia de patrones a nivel microgeográfico (Machordom *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001, Presa *et al.* 2002). Posteriormente, los resultados obtenidos con el análisis de alozimas y amplificación de la región control pusieron de manifiesto la alta diferenciación presente (Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004, 2006, Vera *et al.* 2013). Sin embargo, el número de cursos y localidades comparados en estos estudios fue muy bajo, lo que podría no abarcar la complejidad existente.

Los resultados obtenidos mostraron un alto nivel de estructuración tanto a nivel mitocondrial como nuclear. De esta manera, la estructuración encontrada parece estar relacionada principalmente con patrones de diferenciación entre ríos y cuencas, detectándose a nivel nuclear unos moderados niveles de diferenciación relacionados con patrones hidrológicos entre las localidades estudiadas. Los resultados del análisis de AMOVA fueron coherentes con las estructuras poblacionales descritas empleando el programa *STRUCTURE*, observándose, de manera general, una mayor diferenciación entre ríos o grupos de ríos que entre cuencas o localidades. De hecho, esta alta estructuración concuerda con el patrón descrito previamente en poblaciones mediterráneas de la Península Ibérica (Cortey *et al.* 2004, Vera 2006, Vera *et al.* 2010b, Fernández-Cebrián 2011, Sanz *et al.* 2011a, Martínez *et al.* 2012), siendo común en salmónidos (Costello *et al.* 2003) y poblaciones residentes de Trucha Común europea (Estoup *et al.* 1998, Carlsson *et al.* 1999, Carlsson y Nilsson 2000, Heggenes y Røed 2006, Martínez *et al.* 2007).

Además de entre ríos de cuencas distintas, la alta diferenciación genética se detectó también entre cursos hidrológicos próximos dentro de cada cuenca. Estudios previos realizados en esta especie mostraron la existencia de una compleja estructura en las poblaciones dentro del área mediterránea, generada por numerosos contactos secundarios y procesos de aislamiento y deriva (Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004, Vera 2006, Pujolar *et al.* 2011). Además, esta alta diferenciación local puede ser generada o magnificada por la presencia de barreras artificiales que impidan o disminuyan el flujo de ejemplares entre las poblaciones (Estoup *et al.* 1998, Carlsson *et al.* 1999, Heggenes y Røed 2006, Pujolar *et al.* 2011, Hórreo *et al.* 2011). Sin embargo, esta elevada estructuración también se observó en poblaciones residentes que aparentemente no están aisladas por barreras físicas que dificulten el intercambio génico entre

ellas (Carlsson y Nilsson 2000, Martínez *et al.* 2007, Vera *et al.* 2010b). Por ejemplo, los ríos Dilar y Monachil no presentaron barreras infranqueables que inhibieran la migración entre sus cursos, distando las localidades muestreadas 30,5 Km. Las diferencias entre estas poblaciones fueron muy elevadas ($F_{ST}=1$, $R_{ST} = 0,487$), agrupándose el río Monachil más próximo a las cuencas del Alto Guadalquivir y Guadiana Menor que al Genil. Además, estos ríos mostraron un elevado número de alelos fijados, observándose indicios de antiguos cuellos de botella o de efecto fundador. Un ejemplo más llamativo se detectó dentro del curso del Madera en una distancia de 10 Km. Las dos localidades muestreadas mostraron un elevado nivel de diferenciación nuclear ($R_{ST}= 0,151$, $p < 0,01$), posiblemente generado por un cuello de botella reciente detectado en la localidad MD3. Aún así, el aislamiento entre ellas parece no ser completo, detectándose una migración asimétrica en dirección aguas abajo ($M = 1,442$). Este hecho explicaría el patrón observado por el programa *STRUCTURE*, con la presencia en la localidad MD3 de un 55% de los ejemplares asignados a la población parental situada más aguas arriba (MD1) y próxima al río Segura. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con precaución debido al bajo número de ejemplares analizado. Las oscilaciones de caudal que experimentan estos cursos a lo largo del año podría generar una estructura de metapoblación con pequeños demos interconectados temporalmente. Una estructura similar ha sido descrita en hábitat inestables en poblaciones atlánticas (Laikre *et al.* 2002, Østergaard *et al.* 2003, Jensen *et al.* 2005, Ayllón *et al.* 2006), donde los bajos tamaños efectivos poblacionales y las posibles extinciones locales son contrarrestadas por la elevada migración existente. Sin embargo, al contrario de lo observado en estos trabajos, la estructura microgeográfica encontrada en el sur de la Península Ibérica se habría generado en un escenario en el que la dispersión de los ejemplares está muy limitada, ya sea por la ausencia de poblaciones anádromas, por la presencia de obstáculos artificiales o naturales infranqueables, por las barreras generadas por la oscilación de los caudales (Sanz *et al.* 2011) o por la alta fidelidad a los lugares de freza de esta especie (Vera *et al.* 2010b, Jonsson y Jonsson 2011). De hecho, esta baja movilidad es un patrón recurrente en poblaciones residentes de peces de agua dulce (por ejemplo: Gyllenstein 1985, Ward *et al.* 1994), que ha sido observado previamente en truchas atlánticas no anádromas (Estoup *et al.* 1998, Knouft y Spotila 2002, Höjesjö *et al.* 2007) y en la Península Ibérica (Fernández-Cebrián 2011). Este hecho, sumado a los bajos tamaños efectivos encontrados y a la alta inestabilidad ambiental de la zona, hace a estas poblaciones más sensibles a la extinción local. La baja dispersión de las poblaciones, junto con los bajos tamaños efectivos encontrados y la alta inestabilidad ambiental de la zona, hace a estas poblaciones más sensibles a la extinción local.

Los patrones de diferenciación genética dentro de cada cuenca variaron dependiendo de los cursos comparados. Por un lado, las localidades del Alto Guadalquivir mostraron un origen genético común, con signos de diferenciación generados por un proceso de aislamiento por distancia y una estructura poblacional producida por la variación existente entre sus localidades ($\Phi_{SC} > \Phi_{CT}$). Los diferentes ríos de una cuenca pueden presentar hábitat discretos que darán como resultado un mosaico de poblaciones diferenciadas genéticamente (Bouza *et al.* 1999), con la posible existencia de una alta estructuración local dentro de cada curso fluvial (Estoup *et al.* 1998, Carlsson *et al.* 1999, Carlsson y Nilsson 2000, Heggenes y Røed 2006, Griffiths *et al.*

2009a, Stelkens *et al.* 2012). De hecho, en poblaciones residentes de Trucha Común (Estoup *et al.* 1998, Carlsson *et al.* 1999, Carlsson y Nilsson 2000, Heggenes y Røed 2006, Martínez *et al.* 2007) e ibéricas (Vera *et al.* 2010b, Sanz *et al.* 2011, Fernández 2011) se ha observado una mayor diferenciación entre localidades que entre ríos. Además, la presencia de cuellos de botella recientes a nivel de localidad, junto con los bajos tamaños efectivos poblacionales y la nula migración encontrada, sugiere la existencia de poblaciones claramente aisladas, generadas por la alta fragmentación artificial de la zona (Heggenes y Røed 2006, Hórreo *et al.* 2011).

Por otro lado, el resto de cuencas analizadas mostraron una mayor diferenciación generada por la variación existente entre los ríos más que entre sus localidades de muestreo ($\Phi_{SC} < \Phi_{CT}$). Este patrón es común en las poblaciones anádromas (Morán *et al.* 1995, Hansen y Mensberg 1998, Bouza *et al.* 1999, Ruzzante *et al.* 2001, Hansen *et al.* 2002, Campos *et al.* 2007), aunque se ha observado también recientemente en poblaciones residentes de la Península Ibérica (Vera *et al.* 2013). En estas poblaciones, la estructura hidrográfica es el resultado del flujo genético tanto intra como entre ríos (Morán *et al.* 1995; Hansen y Mensberg 1998; Carlsson *et al.* 1999; Ruzzante *et al.* 2001; Hansen *et al.* 2002), por lo que la proximidad genética entre los distintos cursos fluviales hace suponer la existencia de contactos entre ellos en el pasado. Sin embargo, actualmente las poblaciones de Trucha Común en el sur de la Península Ibérica se encuentran limitadas a las cabeceras de los ríos, en su mayor parte aisladas por barreras infranqueables tanto naturales como artificiales (Sáez 2010, Sáez *et al.* 2010). Por ello, el flujo entre ellas parece improbable o muy pequeño, tal y como ha sido observado en el presente estudio.

Exceptuando el Alto Guadalquivir, no se observó un patrón significativo de aislamiento por distancia, lo que indicaría una mayor relevancia de la deriva genética sobre las poblaciones de Trucha Común suribéricas. Un resultado similar fue obtenido por Pujolar *et al.* (2011) en poblaciones de trucha de linaje *Marmoratus* en Eslovenia, donde se observó una elevada estructuración genética generada por un fuerte impacto de la deriva genética en estas poblaciones. Estudios recientes realizados en la Península Ibérica sugieren que la estructura poblacional y el patrón de dispersión encontrado en el área mediterránea se ajusta a un modelo metapoblacional, con poblaciones locales y temporales interconectadas (Vera *et al.* 2010b, Sanz *et al.* 2011), similar al observado en hábitat inestables del norte de Europa (Østergaard *et al.* 2003, Jensen *et al.* 2005) y en otras poblaciones ibéricas (Ayllón *et al.* 2006). De hecho, este modelo encaja tanto con el observado por Vera *et al.* 2013 en la cuenca del Segura como con las poblaciones comparadas en la presente Tesis. En este escenario, cada río actuaría como una metapoblación que evolucionaría de manera independiente debido a su aislamiento poblacional, con subpoblaciones cuyo tamaño y estabilidad en el tiempo dependerán del reclutamiento y del intercambio de ejemplares (Vera *et al.* 2010b, Sanz *et al.* 2011).

En contraste con los resultados obtenidos a partir de la región D-loop, las matrices de distancias nucleares sugirieron una moderada estructura poblacional en consonancia con el patrón hidrológico de la cuenca del Guadalquivir. El Alto Guadalquivir y el Guadiana Menor mostraron una mayor proximidad genética con todos los marcadores empleados, siendo las diferencias debidas principalmente a la alta estructuración local presente. Los análisis de PCA

mostraron una mayor divergencia entre las cuencas del Genil y Guadiana Menor, disponiéndose los cursos del Alto Guadalquivir en un rango intermedio. De hecho, las localidades más aguas arriba analizadas en esta cuenca presentaron una mayor proximidad a los ríos pertenecientes a la cuenca del Genil, mientras que los cursos más aguas arriba exhibieron una menor divergencia con las poblaciones del Guadiana Menor. De manera general, dentro de cada cuenca el patrón de estructuración concuerda con su red hidrográfica, constituyendo cada río una unidad altamente diferenciada y próxima a los cursos más cercanos geográficamente. El patrón de distribución de la diversidad genética en el sur de la Península Ibérica está claramente influenciado por factores más contemporáneos, originando o maximizando la alta estructuración local encontrada. Sin embargo, a pesar de la alta diversidad presente, aún quedan indicios de los patrones históricos que han influido en la distribución de la especie en esta área. De hecho, determinadas cuencas y ríos son genéticamente similares o presenta una diferenciación pequeña, sugiriendo que fueron colonizadas por la misma población fundadora.

A una escala inferior, cinco de los ríos estudiados mostraron signos de subestructuración poblacional generada por barreras infranqueables. Las dos localidades comparadas del Grande de Bérchules no mostraron diferencias significativas entre ellas ($R_{ST} = -0,9$, $p > 0,05$). Sin embargo, empleando el programa *STRUCTURE* se observaron signos de subestructuración poblacional dentro de este curso. A pesar de que ambas localidades se encuentran separadas por 12 barreras naturales, el aislamiento entre ellas parece no ser completo, detectándose una migración asimétrica en dirección aguas abajo ($M = 2,736$). Este hecho explicaría el patrón observado por el programa *STRUCTURE*, con la presencia en la localidad GB2 de un 31% de los ejemplares asignados a la población parental situada más aguas arriba (CB1). Por otro lado, la presencia de barreras artificiales ha influido notablemente en la estructura genética de los ríos Castril, Maitena, Cacán y Torrente. La presencia de cuellos de botella recientes, junto con los bajos tamaños efectivos poblacionales y la nula migración encontrada sugiere la existencia de poblaciones claramente aisladas (Heggenes y Røed 26, Hórreo *et al.* 2011), generadas por la acción de la deriva genética (Estoup *et al.* 1998, Carlsson *et al.* 1999, Pujolar *et al.* 2011, Hórreo *et al.* 2011). En los ríos Castril y Cacán el aislamiento no es completo, observándose unos valores de diferenciación moderados, bajos ($R_{ST} \leq 0,05$, $p < 0,05$) o no significativos, junto con un gradiente en la proporción media de los grupos parentales desde las localidades más aguas arriba hacia aguas abajo. Sin embargo, los ríos Maitena y Torrente mostraron una diferenciación intrapoblacional moderada o alta ($R_{ST} > 0,05$, $p < 0,05$), sin que pudieran agruparse sus dos localidades dentro del mismo curso fluvial.

La alta diferenciación genética a pequeña escala detectada en el sur de la Península Ibérica ha sido observada previamente en otros salmónidos en poblaciones residentes (Por ejemplo: Estoup *et al.* 1998, Carlsson y Nilsson 2000, Heggenes y Røed 2006, Barson *et al.* 2009, Griffiths *et al.* 2009a, Kanno *et al.* 2011, Stelkens *et al.* 2012), contribuyendo a la diversidad genética global de una región. El carácter local de las poblaciones estudiadas, con distribuciones geográficas restringidas y bajos niveles de dispersión, flujo genético y tamaño poblacional; las hace especialmente vulnerables a las modificaciones del hábitat. A pesar de que los salmónidos pueden responder a los cambios ambientales en pocas generaciones (Haugen y Vøllestad 2000, Hansen *et al.* 2002, Wofford *et al.* 2005, Fraser *et al.* 2011), la capacidad de

adaptación a un medio depende del flujo y deriva genética, así como de la fuerza de la selección y el acervo génico poblacional (Adkison 1995, Hansen *et al.* 2002, 2007, Wofford *et al.* 2005, Hendry *et al.* 2007), por lo que su diversidad genética debe ser mantenida.

IV.4.4. Historia demográfica

La alta diversidad existente en los ríos analizados es el resultado de una compleja historia evolutiva, consecuencia de la historia paleogeográfica y climática del sur de la Península Ibérica, junto con procesos de expansión postglaciales, fuertes cuellos de botella y procesos de deriva genética pasados y actuales. Todo ello ha favorecido la presencia de diferentes linajes evolutivos y la aparición de grandes divergencias a escala tanto macro como microgeográfica. Los resultados obtenidos a nivel nuclear ponen de manifiesto numerosos procesos de cuellos de botellas y expansiones poblacionales recientes, por lo que es muy probable que sucedieran igualmente en el pasado, generando la variación haplotípica mitocondrial actual. De hecho, cuando las expansiones demográficas se producen a partir de poblaciones con tamaños efectivos pequeños, se acumulan nuevas mutaciones que dan como resultado unos niveles de diversidad haplotípica elevados frente a unos bajos de diversidad nucleotídica (Watterson 1984), tal y como se ha observado en el sur de la Península Ibérica.

La estructura poblacional de la Trucha Común en la Península Ibérica es el reflejo de patrones de aislamiento y deriva ocurridos durante el Cuaternario (García-Marín *et al.* 1996, Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004, 2009, Vera 2006, Fernández-Cebrián 2011). La edad de las expansiones demográficas en la cuenca del Guadalquivir se estimó a finales del Pleistoceno Medio (18.0-37.5 años), periodo en el cual se produce un levantamiento y basculamiento de las cuencas del Guadix-Baza y Granada, siendo capturadas por el Guadalquivir (Ruiz-Bustos *et al.* 1990, Ortiz *et al.* 2000, Ruano *et al.* 2000). La actividad tectónica a lo largo de la Cordillera Bética pudo ser el responsable del proceso de captura fluvial de estas cuencas de oeste a este, unido a un proceso de erosión remontante de la cuenca del Guadalquivir hacia su cabecera (Rodríguez-Vidal y Gracia-Prieto 2004). Por otro lado, las glaciaciones parecen haber afectado a la historia demográfica de estos ríos pertenecientes a la cuenca del Guadalfeo, mostrando eventos de expansión alrededor del Pleistoceno Medio (32.000 y 74.100 años) que coinciden con la progresiva retirada de los hielos del episodio glacial de Würm. La existencia de procesos de expansión demográfica estimados por el análisis *Mismatch* a nivel mitocondrial no estuvo soportada por las pruebas de neutralidad, ya que solo el río Lanjarón mostró valores significativos para los estadísticos empleados. El hecho de que estos estadísticos no corroboren un evento de expansión podría deberse a la existencia de diferentes intensidades en la misma, a que tuviera lugar en diferentes escalas espacio-temporales o a la actuación de otros procesos evolutivos que operan dentro de la selección natural. Finalmente, al contrastar los procesos demográficos recientes tanto en la cuenca del Segura como en el río Tus no se detectaron fuerzas demográficas ni eventos de expansión poblacional en las poblaciones analizadas, lo que concuerda con una estabilidad poblacional. Sin embargo, los procesos evolutivos recientes observados en la cuenca (cuellos de botella y expansiones poblacionales) podrían haber enmascarado las señales de estas expansiones (Rogers 1997).

Debido a que la deriva genética actúa más rápido reduciendo la variabilidad genética en las poblaciones pequeñas, el experimentar un cuello de botella puede disminuir drásticamente la variabilidad de una población, incluso aunque el cuello de botella no se prolongue durante muchas generaciones. Una disminución de la variabilidad genética puede implicar que la población no tenga la capacidad de adaptarse a las nuevas presiones selectivas, debido a que la variabilidad genética sobre la que actuaría la selección habría desaparecido ya de la población. Sin embargo, en la mayor parte de los ríos no se detectaron signos de reducciones poblacionales recientes. El exceso de heterocigosis inducido por un cuello de botella es temporal y el tiempo en que puede ser detectado depende tanto del tamaño efectivo de una población como de la tasa y modelo de mutación de los loci estudiados (Luikart *et al.* 1998, Ramey *et al.* 2000). Por lo tanto, aunque los resultados obtenidos sugieren que la mayor parte de las poblaciones se encuentran en estado de equilibrio, esto no significa que no hayan sufrido reducciones poblacionales en el pasado. Por ejemplo, dentro de la cuenca del Guadalfeo se detectaron signos de cuellos de botella en el río Torrente. Sin embargo, los ríos Trevélez y Poqueira mostraron un número elevado de marcadores con una única variante alélica fijada y un bajo número de alelos privados, indicativos de una reducción en la variabilidad genética de la población por la acción de la deriva genética. Además, si estos cuellos de botella se hubieran producido en el pasado, esto implicaría que las poblaciones de trucha habrían sufrido procesos de expansión desde entonces, algo que ha sido detectado en un gran número de poblaciones ($H_e < H_{eq}$). Finalmente, no debe descartarse la presencia de alelos alóctonos en las poblaciones ni la existencia de subestructuración poblacional o migración entre poblaciones próximas distintas genéticamente. Cuando se introducen ejemplares de poblaciones genéticamente muy divergentes, el número de alelos privados o raros pueden aumentar, enmascarando un aumento o disminución de la heterocigosis y generando diferencias significativas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg. Por lo tanto, el efecto Wahlund podría ser una de las causas por las cuales no se han detectado cuellos de botella en la mayor parte de las poblaciones estudiadas. No obstante, el análisis de mezcla poblacional empleando el programa *STRUCTURE* mostró en la mayor de los ríos y localidades analizados una única población parental, siendo el flujo genético muy bajo o inexistente y, por lo tanto, disminuyendo el posible efecto Wahlund sobre el potencial de los análisis.

V. FILOGEOGRAFÍA HISTÓRIA DE LA TRUCHA COMÚN
***SALMO TRUTTA* EN SUROESTE EUROPEO**

V.1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, la mayor parte de las especies muestran un cierto grado de estructuración filogeográfica, normalmente asociado a una divergencia y/o aislamiento genético generado por las modificaciones paleoambientales del paisaje (Avice 1987, 2004). Las especies dulceacuícolas presentan a menudo una fuerte estructura poblacional, en parte debido a su confinamiento dentro de una red fluvial donde es común la presencia de barreras físicas o biológicas que limitan la conexión entre y dentro de los ríos (por ejemplo: Hébert *et al.* 2000, Taylor *et al.* 2003, Koizumi *et al.* 2006, Gómez-Uchida *et al.* 2009, Loxterman *et al.* 2012). Además, la disposición de las cuencas hidrográficas ha estado y está en continuo cambio, pudiendo aislarse o conectarse los cursos fluviales tanto por las modificaciones geográficas, como por los cambios erosivos o climáticos (Bernatchez y Wilson 1998, Waters *et al.* 2001, Willett *et al.* 2014). Estos eventos modifican la composición de las comunidades dulceacuícolas, permitiendo a las especies ampliar su área de distribución y/o aislando poblaciones que podrían potencialmente diferenciarse de la población de origen (entre otros: Zardoya y Doadrio 1999, Waters *et al.* 2001, 2006, Sanjur *et al.* 2003, Burridge *et al.* 2006, Gante *et al.* 2009, Carrera *et al.* 2013).

La crisis salina del Messiniense y las oscilaciones climáticas del Cuaternario han sido tradicionalmente considerados como los principales eventos de diferenciación y diversificación de las especies, siendo especialmente determinantes en la estructuración de la ictiofauna continental europea (Bianco 1990, Hewitt 1996, 2000, 2004; Reyjol *et al.* 2007). Sin embargo, su importancia e impacto relativo sobre los peces de agua dulce está actualmente en debate (entre otros: Levy *et al.* 2009, Perea *et al.* 2010, Dubut *et al.* 2012). Los periodos glaciales e interglaciales del Pleistoceno han influido notablemente tanto en la diversidad genética de la fauna terrestre (entre otros: Tougaard *et al.* 2008, Hofreiter y Stewart 2009) como dulceacuícola (entre otros: Bernatchez y Wilson 1998, Tsigenopoulos *et al.* 2002, Volckaert *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004, 2009, Gante *et al.* 2009). Durante dicho periodo, las penínsulas mediterráneas actuaron especialmente como refugios de fauna, colonizando las latitudes más norteñas tras la retirada de los hielos (Taberlet *et al.* 1998, Hewitt 2000, 2004). Además, la complejidad topográfica y geográfica de estas áreas favoreció la presencia de refugios dentro de los refugios preexistentes, permitiendo la diversificación de las poblaciones y especies durante los periodos glaciales (Cooper y Hewitt 1993, Hewitt 1996, Gómez y Lunt 2007). Todo ello ha contribuido a aumentar la diversidad genética observada actualmente, lo que dificulta la detección de los patrones de distribución anteriores a este periodo.

La Península Ibérica es una de las regiones con mayor biodiversidad del planeta (Myers *et al.* 2000). La distribución de las especies y la alta diversidad presente son debidas a su gran heterogeneidad geográfica y ambiental, a su compleja historia geomorfológica y a los cambios climáticos producidos durante el Cuaternario (Gómez y Lunt 2007). Desde el Tortonense hasta el Pleistoceno Medio, los sistemas fluviales del sur de la Península Ibérica han estado en continuo cambio (de Galdeano y Vera 1991, Vera 2000, de Galdeano y Alfaro 2004). La elevada actividad geomorfológica de la zona provocó la existencia de barreras geográficas que

modificaron la distribución de las redes hidrográficas hasta su disposición actual, aislándose y diferenciándose las especies alopátricamente (Zardoya y Doadrio 1998, Doadrio y Carmona 2003, 2004, Sanjur *et al.* 2003, Gante *et al.* 2010, Sousa-Santos *et al.* 2014). Además, las oscilaciones climáticas del Pleistoceno (Hernández Fernández *et al.* 2007) y la ocupación por los hielos de las cumbre de las cordilleras más altas (Mapa del Cuaternario de España 1:1.000.000, IGME 1989, Gómez-Ortiz *et al.* 1992, Pérez Alberti *et al.* 2004) generaron cambios en la configuración y dinámica fluvial, modificando la calidad y disponibilidad de los hábitats y facilitando la fragmentación, diversificación y extinción de las poblaciones locales (Gante *et al.* 2009).

El conocimiento de los niveles y la distribución de la diversidad genética es esencial para reconstruir patrones filogeográficos e inferir la historia demográfica de las especies (Avice 2004), permitiendo deducir los procesos de colonización y fragmentación que han influido en la distribución espacial de los peces de agua dulce ibéricos (Zardoya y Doadrio 1998, Mesquita *et al.* 2007, Sousa *et al.* 2008, Gante *et al.* 2009, Henriques *et al.* 2010, Lopes-Cunha *et al.* 2012). A pesar del elevado potencial de dispersión de los salmónidos, la Trucha Común presenta en la Península Ibérica un patrón de estructuración genético muy marcado, reflejo de su historia evolutiva. Las poblaciones atlánticas muestran una elevada diferenciación hidrográfica, y sus ejemplares se incluyen dentro de la línea evolutiva *Atlántica sensu* Bernatchez (1992) o *Duero* (Bouza *et al.* 1999, Machordom *et al.* 2000, Cortey *et al.* 2009). Por otro lado, las poblaciones mediterráneas muestran una mayor estructuración local, distribuyéndose los linajes *Adriático* y *Mediterráneo sensu* Bernatchez (1992) en la mayor parte de las cuencas en simpatria (García-Marín y Pla 1996, Machordom *et al.* 2000, Sanz *et al.* 2002, 2011, Cortey *et al.* 2004, Vera *et al.* 2010a, 2013, Fernández-Cebrián 2011, Capítulo IV de la presente Tesis). La distribución de las líneas evolutivas en las cuencas mediterráneas no sigue un patrón geográfico marcado, sino que muestra numerosas zonas de contacto secundario entre los linajes *Adriático* y *Mediterráneo* generadas por procesos de colonización, aislamiento y deriva durante los periodos glaciales y postglaciales (Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004, Cortey 2005, Vera 2006, Fernández-Cebrián 2011).

La amplia distribución de la Trucha Común junto con sus características biológicas, hacen de esta especie un modelo apropiado para entender cómo han influido las variaciones paleogeográficas y climáticas en la diversificación y dispersión de los peces de agua dulce en el área mediterránea. Además, los principales mecanismos y eventos responsables de la estructuración y diversidad genética de la ictiofauna dulceacuícola en el sur de la Península Ibérica no son bien conocidos. Para tratar de arrojar luz sobre estos aspectos, se exploraron los procesos evolutivos que han actuado sobre esta especie a diferentes escalas temporales, utilizando de manera combinada marcadores con diferentes tasas evolutivas y tipos de herencia genética (fragmentos de ADN mitocondrial y nuclear, y loci microsatélites). Estos marcadores se emplearon para estudiar la diversidad y la composición genética de la Trucha Común, a fin de reconstruir su historia evolutiva y los procesos de expansión, fragmentación y contactos secundarios ocurridos en el sur de la Península Ibérica.

V.2. MATERIAL Y MÉTODOS

V.2.1. Análisis de laboratorio

V.2.1.1. Extracción de ADN

El ADN extraído en el Capítulo III fue empleado en el estudio de la evolución y el patrón filogeográfico de la Trucha Común, desarrollado en el presente capítulo de la Tesis.

V.2.1.2. Amplificación y secuenciación de la región control mitocondrial

El número de secuencias de la región D-Loop analizado en el Capítulo IV se aumentó en el presente capítulo hasta los 502 ejemplares mediante la inclusión de 57 truchas pertenecientes a las cuencas del Adra y Andarax (Anexos I y II), homocigotos para el alelo *LDH-C1*100* analizado previamente (Capítulo III) siempre que fuera posible. Los cebadores y las condiciones de PCR empleadas se describen en el Capítulo IV de esta Tesis.

V.2.1.3. Amplificación y secuenciación del gen citocromo b

Se amplificó la secuencia completa del gen citocromo b (Cyt b) de 43 ejemplares de Trucha Común (Anexo II). Dado que este gen se utiliza exclusivamente para estudios filogenéticos y filogeográficos, se seleccionaron previamente ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-C1*100* (Capítulo III) y representativos de los distintos haplotipos mitocondriales definidos previamente en el Capítulo IV para la región D-loop.

El gen Cyt b se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores Glu-F (5'-GAAGAACCACCGTTGTTATTCAA -3') (Zardoya y Doadrio 1998) y Thr-R_ST (5'-ACCTCCGACCTCCGGTTTACA -3'). El oligonucleótido Thr-R_ST se diseñó a partir del primer Thr-R definido por Zardoya y Doadrio (1998) desarrollado para amplificar el gen Cyt b en ciprínidos. Estos oligonucleótidos hibridan específicamente con las regiones conservadas codificantes para ARNt^{Glu} y ARNt^{Thr}, respectivamente. La reacción de PCR se realizó para cada individuo en un volumen de 50 µl con concentraciones finales de 1X de tampón de PCR libre de magnesio, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada cebador, 1 U de enzima *Biotoools HotSplit DNA Polymerase* (Biotoools, Madrid, España) y 100 ng de ADN. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) utilizando un programa de 94°C 5 minutos, 30 ciclos de 94°C 30 segundos, 45°C 30 segundos y 72°C 1 minuto, con una extensión final de 5 minutos a 72°C. El fragmento amplificado se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La secuenciación del gen Cyt b se realizó en ambas direcciones en un secuenciador automático *ABI PRISM 3730* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), utilizando el producto de amplificación previamente purificado con el kit de purificación *BIOCLEAN DNA Purification Columns* (Biotoools, Madrid, España).

V.2.1.4. Amplificación y secuenciación del espaciador interno ribosomal 1

Se amplificó la secuencia completa del espaciador interno ribosomal 1 (ITS1) de 38 ejemplares de Trucha Común (Anexo II). Debido a que este gen se utiliza exclusivamente para estudios filogenéticos y filogeográficos, se seleccionaron previamente ejemplares homocigotos para el alelo *LDH-C1*100* (Capítulo III) y representativos de los distintos haplotipos mitocondriales analizados definidos previamente en el Capítulo IV para la región D-loop.

La región ITS1 se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores kp2 (5'-AAAAAGCTTCCGTAGGTGAACCTGCG-3') y 5.8S (5'-AGCTTGCTGCGTTCTTCATCGA-3') (Phillips *et al.* 1995). Estos oligonucleótidos hibridan específicamente con las regiones altamente conservadas codificantes para los ADN ribosómicos 18S y 5.8S, respectivamente. La reacción de PCR se realizó para cada individuo en un volumen de 50 µl con concentraciones finales de 1X de tampón de PCR libre de magnesio, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada cebador, 1 U de enzima *Biotools HotSplit DNA Polymerase* (Biotools, Madrid, España) y 50 ng de ADN. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) utilizando un programa de 95°C 5 minutos, 30 ciclos de 95°C 1 minuto, 65°C 1 minuto y 72°C 1 minuto, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. El fragmento amplificado se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. La secuenciación de la región ITS1 se realizó en ambas direcciones en un secuenciador automático *ABI PRISM 3730* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), utilizando el producto de amplificación previamente purificado con el kit de purificación *BIOCLEAN DNA Purification Columns* (Biotools, Madrid, España).

IV.2.1.5. Amplificación y genotipado de loci microsatélites

El número de ejemplares analizados en el Capítulo IV se aumentó mediante la inclusión de 106 muestras de Trucha Común pertenecientes a las cuencas del Adra y Andarax (Anexo II) hasta hacer un total de 1436 individuos analizados. Los cebadores y las condiciones de PCR empleadas para los ocho microsatélites amplificados, junto con los criterios de selección de las localidades analizadas son descritos en el Capítulo IV de esta Tesis.

Los programas empleados para el genotipado y la detección de alelos nulos en los loci analizados se indican en el Capítulo III de la presente Tesis.

IV.2.2. Análisis de datos

IV.2.2.1. Asignación de líneas evolutivas e identificación de haplotipos

Las secuencias obtenidas para la región D-loop, Cyt b e ITS1 se analizaron con ayuda del programa *Chromas Lite v.2.01* (Technelysium Pty Ltd, <http://www.technelysium.com.au>) y posteriormente se alinearon usando el programa *ClustalX v.2.1* (Larkin *et al.* 2007). Los alineamientos obtenidos se visualizaron y reanalizaron empleando el editor de secuencias

Geneious Pro v.4.8.3 (Drummond *et al.* 2009). La reconstrucción de las secuencias parentales para la región ITS1 se llevó a cabo siguiendo las pautas descritas por Sousa-Santos *et al.* (2005) desarrolladas para el complejo *Squalius alburnoides* y el gen nuclear beta-actina. Las regiones polimórficas se realinearon, permitiendo la identificación de los distintos haplotipos utilizando el programa *DnaSP v.5.10.01* (Librado y Rozas 2009). Todos los haplotipos fueron comparados con secuencias conocidas de Trucha Común en la base de datos *GenBank* (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA), empleando el algoritmo de búsqueda *BLAST* (Altschul *et al.* 1997) y realineando las secuencias obtenidas con el programa *ClustalX v.2.1*.

Los haplotipos obtenidos se codificaron siguiendo el mismo criterio empleado en el Capítulo IV de esta Tesis para la región D-Loop. Sin embargo, con el fin de diferenciar cada fragmento, las secuencias del gen Cyt b y la región ITS1 fueron codificadas con los subíndices “c” e “i”, respectivamente. El haplotipo definido como foráneo para la región ITS1 fue asignado al linaje *Atlántico Noribérico* (AT_{NH}) y no *Atlántico Exótico* ya que este haplotipo es nativo de toda el área atlántica, encontrándose en poblaciones de truchas nativas en el norte de la Península Ibérica (Almodóvar *et al.* datos no publicados).

Para una mejor comprensión de la relaciones tanto a nivel ibérico como mediterráneo y europeo, se incluyeron en los análisis filogenéticos y filogeográficos 98 muestras de referencia procedentes de *GenBank* y de datos propios (Anexo VI), representativas de todas las líneas evolutivas descritas para la Trucha Común. Los haplotipos de referencia fueron recodificados dentro de las líneas evolutivas descritas por Bernatchez *et al.* (1992) para la región control, indicando con un subíndice el código del haplotipo usado por los distintos autores en el trabajo de procedencia. De la misma manera, se introdujeron 9 secuencias próximas pertenecientes a las especies mediterráneas *S. obtusirostris* y *S. ohridanus*; además de 18 secuencias que se introdujeron como grupo externo múltiple para el análisis filogenético, pertenecientes al Salmón Atlántico (*S. salar*) y salmones del pacífico (*Oncorhynchus masou*, *O. keta*, *O. nerka* y *O. gorbuscha*), procedentes de la base de datos *Genbank* (Anexo VI).

V.2.2.2. Análisis filogenéticos

V.2.2.2.1. Análisis de alineamientos

Los alineamientos obtenidos se editaron previamente con el programa *Gblock v0.91b* (Castresana 2000), eliminando de cada matriz aquellas regiones peor alineadas donde la homología posicional no fuera segura y las distancias genéticas se encontraran muy saturadas. Todos los análisis posteriores se examinaron en primer lugar para cada región amplificada por separado, así como concatenando todos los fragmentos por individuo manualmente con el editor de secuencias *Geneious Pro v.4.8.3*. A continuación, se comprobó el nivel de saturación de cada matriz de datos empleando el programa *DAMBE v.5.2.57* (Xia y Xie 2001), seleccionando el mejor modelo de evolución molecular para cada alineamiento con el programa *jMODELTEST v.2.1.4*. (Darriba *et al.* 2012).

En términos generales, cuanto mayor sea la distancia genética o evolutiva entre dos secuencias, mayor será el número de diferencias nucleotídicas presentes entre ambas. Sin embargo, cuando comparamos secuencias altamente divergentes, locus o posiciones con una elevada tasa de mutación; las diferencias o similitudes encontradas entre las bases podrían no responder a un origen común, sino al propio azar. La posibilidad de múltiples cambios nucleotídicos en una misma posición entre dos secuencias da lugar a un proceso denominado saturación mutacional o saturación de la sustitución nucleotídica. La saturación de un fragmento de una secuencia provocará la pérdida de información filogenética, pudiendo incluso conducir a la inferencia de filogenias erróneas (Xia *et al.* 2003a). La saturación de una secuencia puede detectarse gráficamente representando el número de cambios observados entre dos fragmentos frente a la estimación del tiempo de divergencia entre ambas secuencias (Moritz *et al.* 1987). Para ello, el nivel de saturación de los alineamientos de secuencias obtenidos se analizó gráficamente y mediante el test de Xia (Xia *et al.* 2003b), implementado en el programa *DAMBE* v.5.2.57.

Finalmente, para asignar el mejor modelo de evolución molecular al que se ajusta cada matriz de secuencias se realizó una prueba de verosimilitud utilizando el programa *jMODELTEST* v.2.1.4. La obtención de un árbol filogenético es un problema de inferencia estadística y, como tal, requiere de un modelo que describa las probabilidades con las que se dan los cambios de nucleótidos dentro de un conjunto de secuencias. Los modelos evolutivos son un conjunto de asunciones o simplificaciones que intentan describir los procesos naturales que rigen estas modificaciones. Es decir, tratan de estimar la probabilidad de que en una región determinada de una secuencia un nucleótido mute a otro a lo largo de toda una filogenia. Para determinar el modelo evolutivo que mejor se ajusta a los datos es necesario conocer las frecuencias medias nucleotídicas en todas las posiciones de la secuencia y a lo largo de una filogenia, las tendencias relativas de las bases a ser sustituidas unas por otras (+I, *p-inv*) y, finalmente, describir la tasa de sustitución de cada sitio asumiendo que para cada secuencia la probabilidad de sustitución varía aleatoriamente con una distribución Gamma (+G, Gamma) determinada por su pendiente definida por el parámetro α .

V.2.2.2.2. Variación y divergencia genética

La selección no actúa de igual modo en todas las partes del genoma ni en todos los grupos de organismos, siendo necesario conocer no solo el grado de variabilidad genética para cada marcador sino cómo se reparte esta diversidad entre las distintas poblaciones, linajes evolutivos o especies. Por ello, se estimaron los parámetros de diversidad genética para cada una de las regiones amplificadas, así como la divergencia genética media existente entre los distintos linajes definidos para la Trucha Común y sus especies próximas.

En primer lugar, se calcularon los parámetros de diversidades nucleotídicas (π_n) con el programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.2. El número de haplotipos analizados (N_{HAP}) se calculó manualmente, mientras que el número de posiciones polimórficas (excluyendo inserciones-delecciones (*S*)) y el porcentaje de composición G-C (% G+C) se calcularon empleando el programa *DnaSP* v.5.10.01 (Librado y Rozas 2009). La divergencia genética existente se estimó

analizando el porcentaje de saltos mutacionales a partir de una matriz de distancias obtenida por el programa *PAUP 4.0b10* (Swofford 2002), empleando como matriz de secuencias el modelo evolutivo obtenido según el criterio de información de Akaike (AIC, Akaike 1973) con el programa *jMODELTEST v.2.1.4*.

V.2.2.2.3. Inferencia filogenética

Las relaciones evolutivas entre secuencias, genes y organismos pueden ser representadas a través de un árbol filogenético. Los árboles filogenéticos son estructuras matemáticas similares a los árboles genealógicos donde se muestra qué organismos o secuencias están más estrechamente relacionados entre sí, debido a que sus caracteres compartidos descienden, generalmente con modificación, de un ancestro común. La inferencia de relaciones filogenéticas empleando datos moleculares puede realizarse a partir de una matriz de distancias genéticas entre pares de secuencias o de una matriz de estados (cada nucleótido de una secuencia) de caracteres discretos (secuencias), empleando métodos algorítmicos o criterios de optimización para encontrar la mejor topología del árbol de acuerdo a un criterio seleccionado. El análisis filogenético de los haplotipos obtenidos para las regiones D-loop, Cyt b e ITS1 se realizó utilizando tres métodos de inferencia filogenética: máxima parsimonia (*Maximum Parsimony*, MP), máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*, ML) e inferencia Bayesiana (*Bayesian inference*, BI). Todas las reconstrucciones filogenéticas se generaron tanto para el total de haplotipos obtenidos por gen o región amplificada, como concatenando los fragmentos manualmente con el editor de secuencias *Geneious Pro v.4.8.3*.

La inferencia filogenética de máxima parsimonia MP es un método de búsqueda basado en un criterio de optimización justificado en la idea filosófica de “la navaja de Ockham” y emplea una matriz de estados de caracteres discretos. Este método asume que las mutaciones (cambios de estado) son poco frecuentes, por lo que en ausencia de evidencia contraria, dos caracteres similares son homólogos (Principio auxiliar de Hennig, Hennig 1965). El resultado es uno o varios cladogramas que representan el menor número de transformaciones o cambios entre los estados, es decir, el árbol o árboles más parsimoniosos serán aquellos que presenten el menor número de pasos mutacionales para explicar las diferencias observadas entre los OTUs (Farris 1970, Fitch 1971). Debido a que al aumentar el número de secuencias aumenta rápidamente el número de árboles a evaluar, es necesario emplear un algoritmo de búsqueda de cladogramas heurístico que, aunque no garantiza encontrar el árbol verdadero, sí el o los árboles con menor número de pasos dentro de un espacio de árboles posibles. Los análisis filogenéticos de MP se elaboraron utilizando los programas *TNT v.1.1* (Goloboff *et al.* 2008). Para encontrar los árboles más parsimoniosos se realizaron búsquedas heurísticas de unión aleatoria de taxones (*random addition of taxa*) con 1000 repeticiones, reteniendo 10 árboles por réplica hasta un total de 10.000 árboles. Las topologías óptimas encontradas previamente se sometieron a una reordenación de ramas (*branch swapping*) empleando el algoritmo TBR (*tree bisection and reconnection*). Los árboles obtenidos se agruparon en un árbol de consenso estricto, representando el nivel de confianza de cada rama mediante el porcentaje de veces que son encontrado dos clados juntos.

La inferencia filogenética de máxima verosimilitud ML es un método de búsqueda basado en un criterio de optimización de máxima verosimilitud a partir de una matriz de estados de caracteres discretos. Es decir, este método busca todas las posibles topologías y longitudes de ramas dado un modelo de sustitución, considerando cada posición de un alineamiento dado. Finalmente, selecciona aquel modelo (árbol) que tenga la mayor la probabilidad o verosimilitud de reflejar un proceso evolutivo (Felsenstein 2004). Bajo la asunción de que todas posiciones en un alineamiento evolucionan independientemente y bajo un modelo determinado, se calculará la probabilidad en cada posición evaluando todas las posibilidades a partir de los cuales las secuencias podrían haber aparecido obteniendo un valor de verosimilitud final. La probabilidad conjunta del modelo y el árbol para el conjunto de estados se calcula como el producto de las verosimilitudes individuales. Los análisis filogenéticos de ML se elaboraron utilizando el programa *RAxML* v.7.2.6. (Stamatakis 2006), empleando el modelo evolutivo obtenido según el criterio de información de Akaike (AIC, Akaike 1973) con el programa *jMODELTEST* v.2.1.4. Se especificó para cada fragmento un modelo evolutivo distinto, permitiendo que las tasas de sustitución nucleotídica estimadas variasen de forma independiente en cada gen.

Tanto en los análisis de MP como en los de ML, se ha empleado el método de *bootstrap* o técnica de remuestreo (Felsenstein 1985), para estimar el soporte estadístico de los diferentes clados formados y sus relaciones filogenéticas, con 1000 pseudoréplicas.

La inferencia Bayesiana BI es un método de búsqueda basado en un criterio de optimización apoyado en el teorema de Bayes, calculando las probabilidades posteriores de los árboles a partir de una matriz de estados de caracteres discretos. La BI no busca un único árbol óptimo, sino un conjunto de árboles muestreados en función de su probabilidad posterior. Mientras que el método de ML mide la probabilidad de ajuste de los datos a un árbol y un modelo de sustitución previo, la inferencia Bayesiana se basa en la probabilidad posterior de una hipótesis inicial definida por nuestros datos. Es decir, selecciona los árboles con la probabilidad más alta a partir de un alineamiento y un modelo filogenético dado (Holder y Lewis 2003). Los análisis filogenéticos de BI se elaboraron utilizando el programa *MrBayes* v.3.2. (Ronquist y Huelsenbeck 2003), empleando el modelo evolutivo obtenido bajo el criterio de información de AIC con el programa *jMODELTEST* v.2.1.4. El soporte de los clados se estimó empleando el algoritmo de Monte Carlo a partir de simulaciones de Cadenas de Markov, comenzando los análisis a partir de un árbol aleatorio. Las probabilidades *a priori* fueron designadas a través de una distribución uniforme. Cada análisis consistió en dos simulaciones independientes con cinco millones de generaciones y cuatro cadenas (una fría y tres calientes) cada uno. Los árboles y parámetros obtenidos se submuestrearon cada 100 generaciones para asegurar que las muestras sucesivas fueran independientes, generando 50.000 árboles. En aquellos casos con más de un gen en un mismo análisis, la estima de los parámetros especificados fue independiente para las distintas particiones. Para asegurar que las cadenas de Markov convergieran en cada prueba, se verificó que la varianza reducida entre los dos análisis independientes fuera inferior a 0,01 y se analizó la estacionalidad de los valores de verosimilitud (*logLikelihood*) empleando el programa *Tracer* v.1.6. (Rambaut y Drummond 2007). Se desecharon como *burnin* todos los árboles generados anteriormente a la estabilización de los análisis. El resto de los árboles se combinaron para encontrar la estima de la filogenia con

mayor probabilidad posterior. En este análisis las inserciones-delecciones detectadas en el alineamiento fueron incorporadas a la matriz como datos de presencia/ausencia (1/0).

V.2.2.2.4. Datación y tiempos de divergencia

Partiendo de la hipótesis de que los genes acumulan cambios a una tasa constante la cantidad de diferencias entre dos secuencias, linajes o especies estará relacionada linealmente con su tiempo de divergencia o separación evolutiva (Zuckerkandl y Pauling 1965). De esta manera, a partir de un árbol filogenético es posible estimar las escalas de tiempo para datar eventos evolutivos a partir de un punto de datación conocido, dado por los registros fósiles, los eventos biogeográficos o los procesos geológicos. Es decir, conociendo la edad de un nodo en un árbol es posible estimar el tiempo del resto de nodos o tiempo de divergencia del ancestro común más reciente (*Time to most recent common ancestor*, TMRCA), empleando análisis de reloj molecular. La edad de divergencia y de diversificación de la Trucha Común y de las especies próximas se estimó a partir de la matriz generada con las regiones D-loop, Cyt b e ITS1 concatenadas.

En primer lugar, aunque se asume *a priori* que la tasa evolutiva es homogénea entre genes, regiones genómicas, taxones y linajes; en algunos casos estas asunciones son violadas generando problemas con las calibraciones obtenidas. Por ello, es necesario comprobar si los datos utilizados se ajustan a una hipótesis de reloj molecular, es decir, si las tasas de sustitución son constantes entre los distintos genes y haplotipos utilizados. Para contrastar la homogeneidad de tasas se compararon las diferencias de longitud entre las ramas del árbol de ML, obtenido previamente empleando el modelo evolutivo generado por el programa *jMODELTEST v.2.1.4*, y un nuevo árbol filogenético inferido con el mismo modelo forzando una tasa de sustitución constante mediante un test de verosimilitud (*Likelihood ratio test*, LRT). Se empleó el programa *PAUP v.4.0b10* para calcular la probabilidad de los datos según el modelo evolutivo y parámetros seleccionados previamente, calculando su verosimilitud según la asunción de un reloj molecular y sin él. Los dos valores de probabilidad obtenidos fueron comparados con LRT mediante una prueba de χ^2 utilizando el programa *jMODELTEST v.2.1.4*. Complementariamente, se realizó una prueba de verosimilitud relativa (*relative-rate*) entre los distintos haplotipos y linajes utilizando el programa *RRTree v1.1* (Robinson-Rechavi y Huchon 2000). En ambos casos, si los valores de verosimilitud comparados no son significativamente diferentes, las secuencias analizadas se ajustarían a una hipótesis de reloj molecular.

A continuación, para determinar el tiempo de divergencia de la Trucha Común se empleó un análisis bayesiano utilizando el programa *BEAST v.1.8.0* y la opción de reloj molecular relajado (Drummond *et al.* 2012). Este tipo de método permite que las tasas de sustitución varíen a lo largo de todo el árbol, utilizando distribuciones normales exponenciales o logarítmicas como alternativas. Los análisis bayesianos, al basar sus estrategias de búsqueda en MCMC, no requieren introducir una topología inicial permitiendo incorporar la incertidumbre filogenética al análisis y proporcionar intervalos de confianza a partir de las distribuciones posteriores de las tasas y tiempo evolutivos en cada nodo del árbol (Yang y Yoder 2003). El programa *BEAST v.1.8.0* permite además el uso simultáneo de diferentes parámetros evolutivos

para cada partición y la utilización de más de un punto de calibración en un árbol filogenético (*local clock*), calculando tiempos de divergencia más precisos (Yang y Yoder 2003).

Los análisis bayesianos se elaboraron empleando para cada fragmento el modelo evolutivo obtenido bajo el criterio de información AIC con el programa *jMODELTEST* v.2.1.4, un modelo de reloj molecular “relajado” (*uncorrelated lognormal*) y el modelo de ramificación de Yule (*Yule tree*). El nodo raíz, correspondiente al nodo de diversificación entre el género *Salmo* y *Oncorhynchus*, fue calibrado con una distribución normal entre 26 y 29 millones de años (Crête *et al.* 2012). El grupo *Oncorhynchus* se empleó para asignar dos nodos de calibración internos a partir de datos fósiles. Al nodo de diversificación de las muestras (*O. masau*, (*O. nerka*, (*O. keta*, *O. gorbuscha*))) se le asignó la edad del fósil *O. (Smilodonichthys) rastrusus* (11 millones de años. Stearley y Smith 1993, Crête *et al.* 2012); mientras que el fósil *O. keptosis* se asignó como el ancestro común del grupo (*O. nerka*, (*O. keta*, *O. gorbuscha*)) (8 millones de años. Eiting y Smith 2007, Crête *et al.* 2012). Estos nodos se calibraron con una distribución *lognormal* para forzar que la edad mínima de los fósiles se mantuviera dentro del límite de la distribución (Magallón 2010). Finalmente, durante el Plioceno los movimientos tectónicos del sur de la Península Ibérica habrían favorecido la captura de las aguas del Genil por el Guadalfeo por erosión fluvial (Villegas Molina 1971, Ontiveros y Ramírez 2000), lo que explicaría la presencia del haplotipo **AD_{SI}4** en alta frecuencia en ambas cuencas (Capítulo IV). El haplotipo ancestral **AD_{SI}5**, restringido a la cuenca del Genil, constituyó un clado diferenciado con la secuencia **AD_{SI}4** en los análisis filogenéticos previos, por lo que la divergencia entre estos dos haplotipos debería ser posterior a este evento geográfico. Este suceso se empleó para calibrar el nodo de diversificación entre estas secuencias, asignándose una edad entre 5,3 y 2,6 millones de años. Las distribuciones posteriores para cada nodo fueron calculadas a partir de submuestreos cada 1000 generaciones durante 500.000.000 de interacciones de MCMC, descartando como “*burnin*” el 80% de los resultados iniciales. Para asegurar que las cadenas de Markov convergieron en cada análisis, se analizó la estacionalidad de los valores de verosimilitud empleando el programa *Tracer* v.1.6. Los árboles obtenidos se combinaron y resumieron, obteniéndose un único árbol de máxima credibilidad con las probabilidades posteriores, tiempo de divergencia de cada nodo y la probabilidad de error al 95% de cada nodo.

V.2.2.3. Análisis filogeográficos

V.2.2.3.1. Redes de haplotipos

Para poder estimar los principios y procesos que determinaron la distribución geográfica actual de la Trucha Común tanto en el sur de la Península Ibérica como a nivel mediterráneo, se construyó una red de haplotipos utilizando la parsimonia estadística (Templeton *et al.* 1992) con el programa *TCS* v.1.21. (Clement *et al.* 2000). El programa *TCS* agrupa las secuencias analizadas en haplotipos, conectándolos entre sí y generando haplotipos intermedios no muestreados, calculando el número de saltos mutacionales entre ellos que permite la parsimonia estadística. Si el número de cambios es mayor que este límite, las redes se presentarán inconexas. La construcción de redes de este tipo ha sido recomendada para estudios

filogenéticos intraespecíficos (Posada y Crandall 2001), debido a que los procesos evolutivos que actúan a nivel poblacional generan relaciones reticuladas que no pueden ser representadas empleando árboles clásicos generados por los métodos tradicionales de reconstrucción filogenética. Los árboles filogenéticos sitúan a todos los haplotipos en los nodos terminales asumiendo que los ancestrales están extintos cuando, según la teoría de la coalescencia, son los más frecuentes en la población y presentan un gran número de conexiones mutacionales con los más recientes (Watterson y Guess 1977, Crandall y Templeton 1993).

Las redes de haplotipos se generaron a partir de una matriz de datos con todas las secuencias obtenidas para cada región amplificada por separado, asignado cada muestra a una de las siete cuencas de estudio. Se incluyeron todos los haplotipos de referencia empleados en los análisis filogenéticos (Anexo VI), asignando cada muestra a su ecorregión de agua dulce correspondiente (Abell *et al.* 2008).

V.2.2.3.2. Historia biogeográfica

El estudio de la historia biogeográfica permite inferir la distribución ancestral más probable de los linajes y/o especies, así como identificar las causas o procesos que han modelado estas distribuciones en el tiempo a partir de una distribución actual. El uso de estas reconstrucciones, junto con el conocimiento de los tiempos de divergencia del ancestro común más reciente, permite esclarecer con mayor detalle la evolución de los organismos, dando robustez a su posible historia evolutiva.

Para explorar los eventos que han influido en la distribución actual de la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica, se reconstruyeron las áreas ancestrales para los linajes *Adriático* y *Mediterráneo* para toda el área mediterránea empleando un análisis estadístico de Dispersión-Vicarianza (S-DIVA, *Statistical Dispersal-Vicariance Analysis*, Yu *et al.* 2010), implementado en el programa *RASP v2.1* (Yu *et al.* 2014). Este tipo de análisis permite que las relaciones entre las áreas generadas sean reticuladas y múltiples, proporcionando la posibilidad de dispersión de los nodos ancestrales, incorpora la incertidumbre filogenética y considera explícitamente los eventos de dispersión, extinción y vicarianza. Para cada nodo, los eventos encontrados fueron asignados a un periodo de tiempo evolutivo, siendo representados gráficamente empleando una distribución normal para cada nodo con el programa *RASP v2.1*. Para ello, se construyeron previamente dos árboles ultramétricos de las líneas evolutivas *Adriática* y *Mediterránea* a partir de una matriz de datos concatenados, incluyendo una muestra por cada cuenca y ecorregión de agua dulce analizada (Anexo VI) y asignando cada secuencia a una de las ecorregiones de agua dulce. Esta clasificación permite, de una manera general, obtener las distribuciones ancestrales y entender la evolución de las mismas dentro de la evolución paleogeográfica del área mediterránea. Debido a la alta capacidad de dispersión de la Trucha Común, no se excluyeron aquellos intervalos o agrupaciones de áreas ancestrales separadas geográficamente, asignando como máximo agrupaciones de cuatro áreas.

Los análisis bayesianos previos se elaboraron utilizando el programa *BEAST v.1.8.0*, empleando para cada fragmento el modelo evolutivo obtenido según el criterio de información

bayesiana con el programa *jMODELTEST* v.2.1.4, un modelo de reloj molecular estricto y un modelo coalescente asumiendo un tamaño poblacional constante a lo largo de las generaciones (*Coalescent Constant Population*). Los nodos raíz, correspondientes a los puntos de diversificación de cada linaje, se calibraron con una distribución normal incluyendo la edad de diferenciación obtenida previamente en la datación global del árbol filogenético. Dentro de la línea evolutiva *Adriática*, el nodo de diversificación entre los haplotipos **AD_{ST}4** y **AD_{ST}5** se calibró con una distribución normal entre 5,3 y 2,6 millones de años, sin forzar su origen monofilético. Las distribuciones posteriores para cada nodo se calcularon a partir de submuestreos cada 5.000 generaciones durante 100.000.000 de interacciones de MCMC, descartando como “*burnin*” el 80% de los resultados iniciales. Para asegurar que las cadenas de Markov convergieran en cada análisis, se analizó la estacionalidad de los valores de verosimilitud empleando el programa *Tracer* v.1.6. Los árboles obtenidos fueron combinados y resumidos, obteniéndose un único árbol de máxima credibilidad con las probabilidades posteriores, tiempo de divergencia de cada nodo y el intervalo de confianza al 95% de cada nodo.

V.2.2.4. Estructuración poblacional

La estructuración presente en el sur de la Península Ibérica se analizó tanto a nivel mitocondrial como nuclear empleando los resultados obtenidos para la región D-Loop y los loci microsatélites. Para ello, las poblaciones fueron subdivididas en ríos y cuencas; permitiendo la realización de un análisis jerarquizado y la estimación de estructuración genética a estos niveles. En el Capítulo IV de la presente Tesis se explican más detalladamente los métodos de análisis poblacionales citados a continuación.

En primer lugar, para estudiar los valores de diferenciación genética interpoblacional se calcularon los índices de fijación F_{ST} (Weir y Cockerham 1984) y R_{ST} (Slatkin 1995) en el programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.2. (Excoffier y Lischer 2010). La divergencia mitocondrial entre pares de poblaciones, expresada con el índice F_{ST} se corrigió con el modelo Tamura y Nei (Tamura y Nei 1993), mientras que para los loci microsatélites se empleó el índice R_{ST} asumiendo un modelo de mutación por pasos (Valdés *et al.* 1993). Los valores de significación se obtuvieron por permutación (1000 réplicas) de la matriz de frecuencias alélicas, con y sin corregir el nivel de significación aplicando Bonferroni (Rice 1989). Las matrices de distancias genéticas F_{ST} y R_{ST} obtenidas se representaron gráficamente utilizando el análisis de PCA, empleando el programa *GENALEX* v. 6.3 (Peakall y Smouse 2006).

A continuación, las relaciones interpoblacionales entre los ríos se representaron por medio de fenogramas no rotados. Las diferencias genéticas mitocondriales se estimaron previamente a partir de una matriz de distancias corregida con el modelo Tamura y Nei con el programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.2., agrupándose por el método de inferencia de *NJ* implementado en el paquete *PHYLIP* v.3.69. (Felsenstein 2010). Por otro lado, las distancias genéticas nucleares se calcularon a partir de una matriz de frecuencias génicas de loci microsatélites, empleando el índice de distancias de Nei (Nei 1972) y el modelo de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza y Edwards 1967) incluidos en el paquete *PHYLIP* v.3.69. Cada matriz se representó con

un fenograma empleando el método de inferencia de *NJ* implementado en el paquete *PHYLIP* v.3.69. En todos los casos, el soporte de cada rama se calculó generando 1000 réplicas de cada matriz de datos con el paquete *PHYLIP* v.3.69 y se visualizó con el programa *FigTree* v1.2. (Rambaut 2008).

Por otro lado, se estimaron las distancias genéticas nucleares entre todos los ejemplares a partir de una matriz de frecuencias génicas de loci microsatélites, empleando el modelo de Cavalli-Sforza. La matriz obtenida se representó en un fenograma empleando el método de agrupamiento de *NJ* implementado con el programa *POPULATIONS* v1.2.32. (Langella 1999).

Seguidamente, las frecuencias alélicas de microsatélites se emplearon para estimar la estructura poblacional utilizando el método de agrupación bayesiano implementado en el programa *STRUCTURE* v.2.3.3. (Pritchard *et al.* 2000), asumiendo un modelo de mezcla poblacional y de frecuencias alélicas correlacionadas. Para cada valor de *K* comprendido entre 1 y 10 se analizaron 10 simulaciones, con 30.000 interacciones para el “*burnin period*” seguidos de 1.000.000 de interacciones adicionales (*number of MCMC*). El número de unidades genéticas *K* se estimó siguiendo las recomendaciones de Pritchard *et al.* (2010) a partir de un estudio de simulación de Evano *et al.* (2005). Una vez definido el valor de *K* la matriz fue reanalizada empleando 30.000 interacciones para el “*burnin period*” seguidos de 5.000.000 de interacciones adicionales (*number of MCMC*), asignando cada ejemplar a una población parental determinada si la proporción del genoma (*q*) para un grupo determinado es superior a 0,65 (65%).

Finalmente, para establecer y cuantificar el nivel de estructuración geográfica de las poblaciones de estudio se empleó el método de AMOVA (Excoffier *et al.* 1992), utilizando el programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.2 tanto a nivel mitocondrial como nuclear. El cálculo de la significación de las comparaciones por pares entre poblaciones se estimó por permutaciones no paramétricas (1000 réplicas) de cada matriz de datos.

V.3. RESULTADOS

V.3.1. Análisis filogenéticos

V.3.1.1. Análisis de los alineamientos de secuencias

El origen geográfico y el número de haplotipos encontrado se muestran en el Anexo VI, así como las las secuencias y origen de los haplotipos de referencia ibérica y europea empleados.

En relación a los alineamientos obtenidos, solo la matriz correspondiente al fragmento D-Loop presentó regiones donde la homología posicional no es segura, que fueron eliminadas por Gblocks. De esta manera, la longitud de las secuencias empleadas en los análisis filogenéticos fue de 991 pb para la región D-Loop, 1141 pb para el gen Cyt b y 573 pb para el fragmento ITS1. Aproximadamente un 40% de los haplotipos de referencia de la matriz

concatenada mostraron secuencias incompletas para el gen Cyt b, por lo que se emplearon únicamente 295 pb para este gen.

Por otro lado, el análisis gráfico de las matrices mostró en todos los casos una saturación mutacional baja, generada por una ligera saturación de las transiciones frente a las transversiones. Dentro del gen Cyt b, las terceras posiciones de cada codón exhibieron una saturación baja, aunque ligeramente superior del resto de posiciones, observándose un patrón de saturación transición-transversión similar al obtenido para todo el gen. Los test de Xia mostraron un nivel de saturación bajo, pudiendo ser incluidas las secuencias en los análisis filogenéticos y filogeográficos.

Finalmente, empleando el criterio de información de Akaike, los mejores modelos evolutivos para cada partición fueron el modelo GTR+G+I para la región D-Loop, Hasegawa, Kishino y Yano (1995) con proporción de sitios invariables (HKY+I) para la primera y segunda posición de cada codón del gen Cyt b, GTR para la tercera posición de cada codón y GTR+G para el fragmento ITS1. Estos modelos fueron utilizados tanto para la obtención de las matrices de divergencia genética como en las inferencias filogenéticas de *BI* y *ML*. En último lugar, tras generar los árboles ultramétricos para estudiar la historia filogeográfica de los linajes *Adriático* y *Mediterráneo*, en ambas matrices los mejores modelos evolutivos obtenidos según AIC fueron los modelos GTR+G+I para la región D-Loop, HKY para las primeras y segundas posiciones de cada codón para el gen Cyt b y GTR para la tercera posición, y HKY+I para el fragmento ITS1.

V.3.1.2. Variación y divergencia genética

Los parámetros de diversidad y variación genética para los linajes evolutivos de *S. trutta* y las especies próximas del género *Salmo* utilizadas como referencia para cada fragmento se indican en la Tabla V.1. En el Anexo VII se muestran las distancias genéticas en porcentaje de cambios entre los haplotipos observados a partir de la comparación de las secuencias de D-Loop, Cyt b e ITS1. Las secuencias pertenecientes al género *Salmo* mostraron un porcentaje de variación nucleotídica que osciló entre el 0 y 6%, con un valor medio del 1%. El gen Cyt b presentó los mayores niveles de divergencia media entre las secuencias (10%, rango de divergencia 0-62%), con 231 posiciones polimórficas. La región D-Loop mostró unos valores de divergencia inferiores (1%, rango de divergencia 0-8%) con 103 saltos mutacionales y 14 inserciones-delecciones. Finalmente, el fragmento nuclear ITS1 presentó unos valores de diversidad menores, con 18 posiciones variables y dos inserciones-delecciones, mostrando una divergencia media del 1% (rango de divergencia 0-3%).

Dentro de la Trucha Común los haplotipos presentaron un porcentaje de variación nucleotídica que osciló entre el 0,3 y el 2%, con un valor medio del 0,8%. La región control mostró unos niveles de divergencia media del 1% (rango de divergencia 0,2-2%), con 64 posiciones polimórficas y seis inserciones-delecciones. El gen Cyt b exhibió un nivel de divergencia similar (1%, rango de divergencia 0,5-2%), aunque con un menor número de saltos mutacionales (41). Los resultados obtenidos al comparar la región ITS1 fueron ligeramente inferiores (0,7%, rango de divergencia 0-1%), con 12 posiciones variables y 2 inserciones-

delecciones. A continuación se explican con más detalle los resultados obtenidos para los linajes *Adriático* y *Mediterráneo*, presentes de forma nativa en el sur de la Península Ibérica.

Dentro de la línea *Adriática* los haplotipos presentaron un porcentaje de variación nucleotídica que osciló entre el 0 y el 1%, con un valor medio del 0,4%. El fragmento ITS1 exhibió los mayores niveles de divergencia media (0,5%, rango de divergencia 0,2-1%), con seis posiciones polimórficas y una inserción-delección. La región D-loop mostró unos valores similares (0,5%, rango de divergencia 0-1%), aunque con un mayor número de saltos mutacionales (32), mientras que el gen Cyt b presentó unas estimas de diversidad inferiores, con cinco posiciones variables (0,2%, rango de divergencia 0-0,5%). Los resultados obtenidos al comparar los haplotipos *Adriáticos-Suribéricos* mostraron una variación entre el 0,1 y el 0,5%, con un valor medio del 0,2%. El fragmento ITS1 presentó unos niveles de divergencia bajos (0,2%, rango de divergencia 0,2-0,4%), generados por dos posiciones variables. La región control del ADN mitocondrial mostró unos valores de divergencia media similares (0,2%, rango de divergencia 0,1-0,3%), con tres saltos mutacionales; mientras que el gen Cyt b presentó tres posiciones variables y unos valores de diversidad ligeramente inferiores (0,1, rango de divergencia 0,1-0,2%).

La variación encontrada dentro del linaje *Mediterráneo* fue ligeramente inferior, con un valor medio del 0,3% (rango de divergencia 0-0,7%). La región ITS1 presentó los mayores niveles de divergencia media entre las secuencias (0,4%, rango de divergencia 0,2-0,7%), con cinco posiciones polimórficas y una inserción-delección. La región D-Loop mostró unos valores similares (0,3%, rango de divergencia 0-0,7%), presentando 17 saltos mutacionales, mientras que el gen Cyt b exhibió unos valores de diversidad ligeramente inferiores, con dos posiciones variables y una divergencia media del 0,2%. Al comparar los haplotipos *Mediterráneos-Ibéricos* encontrados en los ríos suribéricos se observó una variación entre el 0,1 y el 0,4%, con un valor medio del 0,2%. El gen Cyt b presentó unos niveles de divergencia del 0,2%, con tres posiciones variables entre las dos secuencias amplificadas. La región ITS1 mostró unos valores de divergencia similares (0,2%, rango de divergencia 0,2-0,4%), debida a dos saltos mutacionales; mientras que el fragmento D-Loop presentó unos valores de diversidad ligeramente inferiores, con tres posiciones polimórficas y una divergencia media del 0,1%.

La comparación de la divergencia genética entre las líneas *Adriática* y *Mediterránea* ofreció como resultado una variación entre el 0,3 y el 1%, con un valor medio del 0,6%. El gen Cyt b presentó los mayores niveles de divergencia media (0,9%, rango de divergencia 0,7-1%), con 11 posiciones variables. Las regiones D-Loop e ITS1 mostraron unos valores ligeramente inferiores del 0,7%. Los niveles de divergencia oscilaron entre el 0,3 y 1,5% para la región control, con 44 saltos mutacionales, mientras que el fragmento ITS1 presentó un rango de divergencia entre el 0,4 y el 1%, con 12 posiciones variables y una inserción-delección. Los resultados obtenidos al comparar los haplotipos *Adriáticos-Suribéricos* y *Mediterráneos-Ibéricos* mostraron una variación entre el 0,4 y el 0,8%, con un valor medio del 0,6%. El fragmento ITS1 presentó unos niveles de divergencia elevados (1%, rango de divergencia 0,7-1%), con seis posiciones variables. El gen Cyt b mostró unos valores de divergencia ligeramente inferiores (0,9%, rango de divergencia 0,7-1%), generado por seis saltos mutacionales, mientras

que la región D-Loop presentó unos valores de diversidad inferiores, con ocho posiciones polimórficas y una divergencia media del 0,6% (rango de divergencia 0,4-0,7%).

Tabla V.1. Parámetros de diversidad y variación genética para las regiones D-Loop, Cyt b e ITS1 estimados para la Trucha Común y sus especies próximas de referencia. Parámetros estimados: número de haplotipos analizados (N_{HAP}), diversidad nucleotídica (π_n), número de posiciones polimórficas, excluyendo inserciones-delecciones (S), porcentaje de la composición G-C (% G+C) y divergencia genética media en porcentaje de cambios nucleotídicos y su desviación estándar (Divergencia).

	N_{HAP}	π_n	S	% G+C	Divergencia
D-Loop					
<i>S. trutta</i> linaje Adriático	27	0,004 ± 0,001	32	37,3	0,46 ± 0,25
<i>S. trutta</i> linaje Atlántico	11	0,004 ± 0,000	10	37,0	0,37 ± 0,18
<i>S. trutta</i> linaje Danubio	2	0,002 ± 0,001	2	37,1	0,20 ± 0,00
<i>S. trutta</i> linaje Duero	2	0,001 ± 0,000	1	37,2	0,10 ± 0,00
<i>S. trutta</i> linaje Mediterráneo	15	0,003 ± 0,001	17	37,5	0,31 ± 0,17
<i>S. trutta</i> linaje Marmoratus	2	0,001 ± 0,001	1	37,3	0,10 ± 0,00
<i>S. obtusirostris</i>	2	0,003 ± 0,002	3	37,4	0,31 ± 0,00
<i>S. ohridanus</i>	2	0,001 ± 0,001	1	37,5	0,10 ± 0,00
<i>S. salar</i>	2	0,012 ± 0,006	12	37,0	1,28 ± 0,00
Total	65	0,011 ± 0,002	103	37,3	1,29 ± 1,49
Cyt b					
<i>S. trutta</i> linaje Adriático	9	0,001 ± 0,000	5	46,1	0,22 ± 0,16
<i>S. trutta</i> linaje Atlántico	7	0,004 ± 0,001	11	46,6	0,40 ± 0,18
<i>S. trutta</i> linaje Danubio	1	-	-	-	-
<i>S. trutta</i> linaje Duero	1	-	-	-	-
<i>S. trutta</i> linaje Mediterráneo	2	0,002 ± 0,001	2	46,7	0,18 ± 0,00
<i>S. trutta</i> linaje Marmoratus	1	-	-	-	-
<i>S. obtusirostris</i>	1	-	-	-	-
<i>S. ohridanus</i>	2	0,028 ± 0,014	32	44,9	3,34 ± 0,00
<i>S. salar</i>	2	0,005 ± 0,003	6	45,6	0,54 ± 0,00
Total	26	0,037 ± 0,013	231	46,2	11,49 ± 19,70
ITS1					
<i>S. trutta</i> linaje Adriático	6	0,005 ± 0,001	6	62,8	0,51 ± 0,29
<i>S. trutta</i> linaje Atlántico	3	0,007 ± 0,002	6	63,1	0,71 ± 0,18
<i>S. trutta</i> linaje Danubio	1	-	-	-	-
<i>S. trutta</i> linaje Duero	1	-	-	-	-
<i>S. trutta</i> linaje Mediterráneo	6	0,004 ± 0,001	5	62,6	0,42 ± 0,20
<i>S. trutta</i> linaje Marmoratus	1	-	-	-	-
<i>S. trutta</i> linaje no definido	2	0,080 ± 0,002	9	62,9	0,78 ± 0,34
<i>S. obtusirostris</i>	1	-	-	-	-
<i>S. ohridanus</i>	1	-	-	-	-
<i>S. salar</i>	2	0,009 ± 0,004	5	62,6	0,89 ± 0,00
Total	27	0,007 ± 0,001	18	62,7	0,89 ± 0,52

V.3.1.3. Inferencia filogenética

Los árboles de BI, ML y MP construidos empleando los fragmentos D-Loop, Cyt b y la matriz de datos concatenados (D-Loop, Cyt b e ITS1) mostraron topologías similares. Las principales relaciones filogenéticas fueron las mismas y tenían buen soporte, cambiando ligeramente la topología entre algunos linajes evolutivos, aunque sin soporte, y entre los nodos terminales como resultado de un mayor número de politomías. Los árboles filogenéticos generados a partir de la región ITS1 presentaron diferencias entre varias de las relaciones encontradas, aunque con un grado de soporte muy débil en todos los análisis. Excluyendo *S. salar*, el resto de haplotipos pertenecientes al género *Salmo* mostraron unos valores de divergencia genética para esta región bajos (<1%, rango de divergencia 0-1%). Estos resultados, sumados a un alto número de politomías y a un bajo soporte de los árboles obtenidos, no permitieron detectar las relaciones filogenéticas existentes, por lo que los resultados para esta región de forma aislada deben tomarse con cautela y no han sido detallados en la presente Tesis.

Los árboles de BI obtenidos junto con los valores de probabilidad posterior y *bootstrap* correspondientes a los análisis de BI, ML y MP son mostrados en las Figuras V.1 a V.3. Excluyendo el grupo externo del género *Oncorhynchus*, la especie *S. ohridanus* mostró una posición basal al resto de secuencias empleando las matrices de Cyt b y las tres regiones concatenadas. Para estas matrices, esta especie presentó unas tasas de sustitución nucleotídica significativamente superiores al resto de haplotipos en todos los análisis. La inclusión de un organismo “*fast-clock*” podría generar problemas en la filogenia obtenida, ya que su disposición en un árbol podría ser causada por la inconsistencia entre las tasas de sustitución comparadas, debiendo ser eliminados de los análisis siempre que sea posible. Tras excluir *S. ohridanus*, todos los análisis apoyaron fuertemente a la especie *S. salar* como un clado hermano del resto de secuencias del género *Salmo*, mostrando los árboles características comunes y algunas variaciones dependiendo de la matriz y el análisis empleado.

Los principales linajes descritos por Bernatchez *et al.* 1992, Bernatchez (2001) y Suárez *et al.* (2001) formaron clados monofiléticos fuertemente diferenciados, posicionándose *S. obtusirostris* al mismo nivel como una línea evolutiva diferenciada. Sin embargo, las relaciones filogenéticas entre estos linajes no pudieron ser apoyadas debido a las diferentes topologías y/o a los bajos valores de soporte observados. Las topologías obtenidas en los análisis de BI y ML a partir del fragmento D-Loop y de las regiones concatenadas muestran una situación ancestral de la línea *Danubio*, situándose los linajes *Atlántico* y *Duero*, junto con *S. obtusirostris*, como un grupo hermano de las líneas mediterráneas (*Adriático*, *Mediterráneo* y *Marmoratus*) en los análisis de ML. Esta disposición basal de la línea *Danubio* no se observó al emplearse el gen Cyt b, agrupándose junto con los linajes mediterráneos con un buen soporte filogenético. La monofilia de los linajes atlánticos *Duero* y *Atlántico* fue apoyada por parte de la región D-Loop, con unos elevados valores de probabilidad posterior y medios de *bootstrap* en la inferencia de ML. Sin embargo, este origen monofilético no tuvo soporte en el resto de comparaciones empleadas. De hecho, aunque la matriz concatenada muestra una topología similar, el árbol filogenético generado a partir del gen Cyt b exhibe una diversificación basal del linaje *Duero*, separándola del resto de líneas evolutivas definidas para la especie *S. trutta*. Finalmente, la

monofilia de los linajes mediterráneos (*Adriático*, *Mediterráneo* y *Marmoratus*) no estuvo bien soportada en ninguno de los análisis filogenéticos, agrupándose como subclados altamente diferenciados.

Cabe destacar que salvo excepciones, dentro de cada línea evolutiva las relaciones entre los distintos haplotipos mostraron bajo soporte, presentando un elevado número de politomías en los nodos terminales. De esta manera, los haplotipos *Adriático* con distribuciones restringidas a las cuencas del Guadalfeo y Genil (**AD_{SI}4** y **AD_{SI}5**), río Constraiç en la cuenca del Ebro (**AD_{ADcs16}** y **AD_{ADcs17}**), cuencas corsas (**AD_{ADcs23}**, **AD_{ADcs24}** y **AD_{ADcs25}**) y mediterráneo francés (**AD_{ADcs21b}** y **AD_{ADcs22}**) e italiano (**AD_{AD}** y **AD_{S.t.m.}**) mostraron subclados diferenciados tanto para la región control como al ser analizada la matriz con las regiones concatenadas. Las secuencias designados como *Salmo platycephalus* por Susnik *et al.* (2004) (**AD_{S.platycephalus}**) y *Salmo letnica* por Susnik *et al.* (2007) (**AD_{hap12}** y **AD_{hap17}**) mostraron una diferenciación similar, formando subclados diferenciados para la región D-Loop y la matriz concatenada.

V.3.1.4. Datación y tiempos de divergencia

La datación absoluta fue realizada construyendo un árbol filogenético por inferencia bayesiana, empleando la matriz de genes concatenada e incluyendo todas las muestras de referencia, con la excepción de *S. ohridanus* al ser clasificado como un organismo “*fast-clock*”. Tres de los cuatro puntos de calibrado del árbol se encontraron filogenéticamente algo “alejados” de los nodos terminales, por lo que intervalos de tiempo asociados a una probabilidad del 95% fueron relativamente elevados. A pesar de este rango de error asociado, los resultados obtenidos ofrecen una valiosa información sobre los eventos evolutivos dentro de esta especie.

El árbol ultramétrico obtenido y las principales fechas de datación absoluta en millones de años, junto con su probabilidad al 95% asociada, se muestra en la Figura V.4. La diversificación de la Trucha Común comenzó hace entre 21 y 11 millones de años, momento en el que se separaron los grandes linajes evolutivos. Las cuatro grandes líneas mediterráneas descritas por Bernatchez *et al.* 1992 empezaron a divergir hace entre 18 y 8 millones de años. En relación a los linajes *Adriático* y *Mediterráneo*, la diversificación de ambos clados pareció ocurrir en el mismo periodo de tiempo, hace entre 16 y 6 millones de años. Este periodo en el tiempo fue ligeramente anterior al obtenido para la separación de los linajes *Atlántico* y *Duero* en la Península Ibérica (entre 14 y 5 millones de años), separándose basalmente del resto de haplotipos *Atlánticos*.

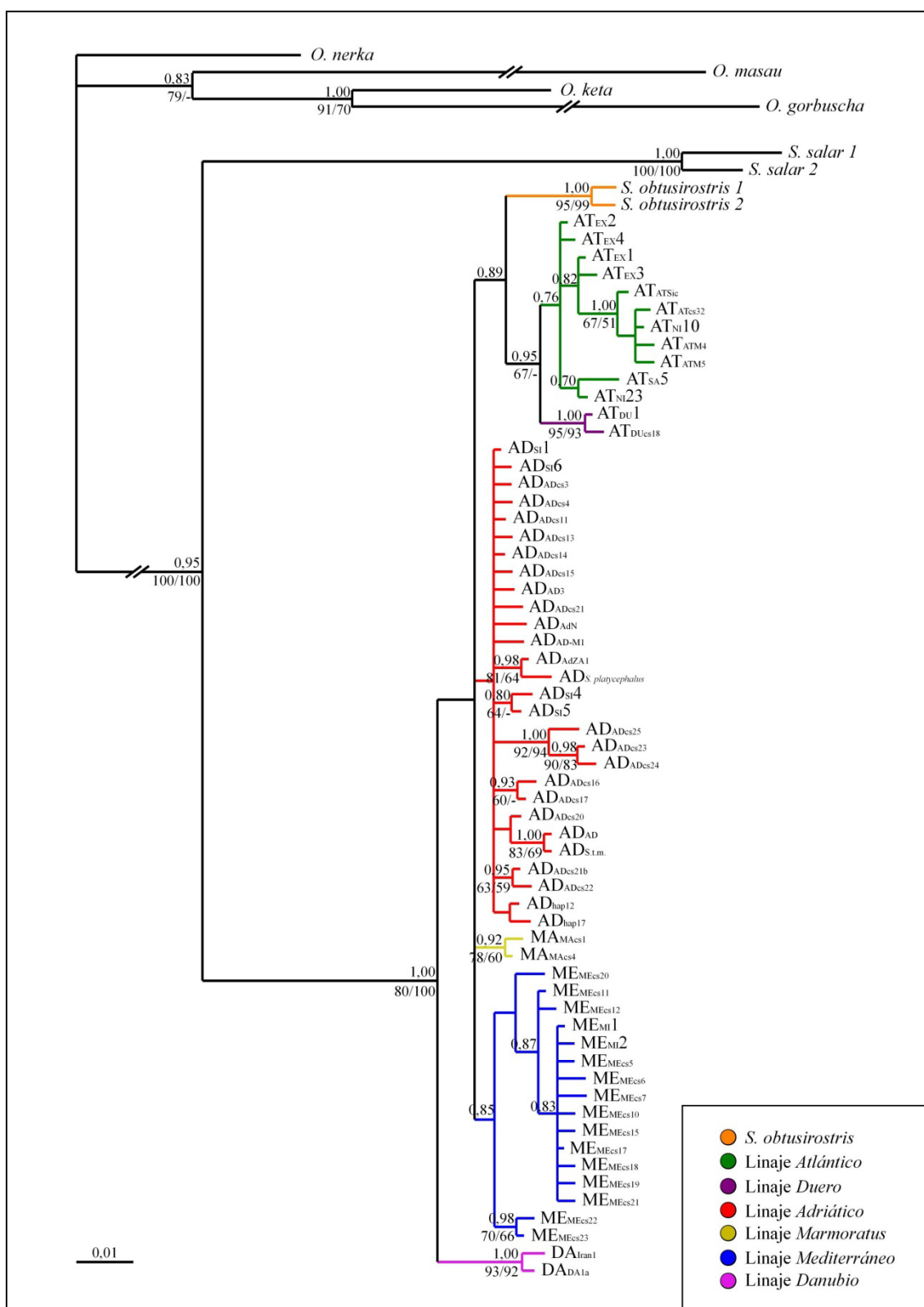


Figura V.1. Topología obtenida en el estudio comparado de la región D-Loop mediante el método de inferencia filogenética BI. Los valores de probabilidad posterior superiores a 0,8 se indican sobre las ramas del árbol. Los valores de *bootstrap* superiores a 60 obtenidos en los análisis de ML y MP se indican bajo las ramas del árbol.

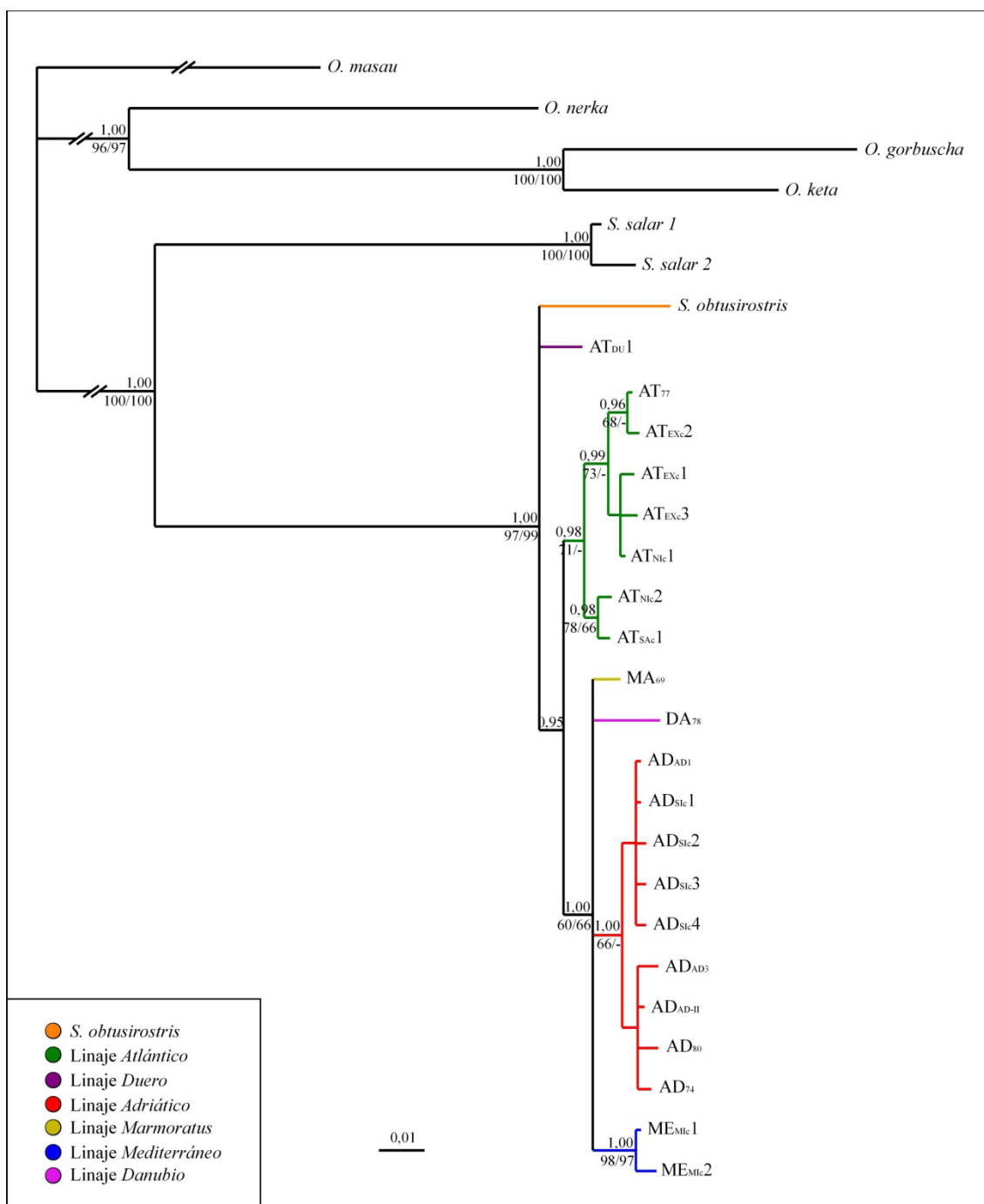


Figura V.2. Topología obtenida en el estudio comparado de la región Cyt b mediante el método de inferencia filogenética BI. Los valores de probabilidad posterior superiores a 0,8 se indican sobre las ramas del árbol. Los valores de *bootstrap* superiores a 60 obtenidos en los análisis de ML y MP se indican bajo las ramas del árbol.

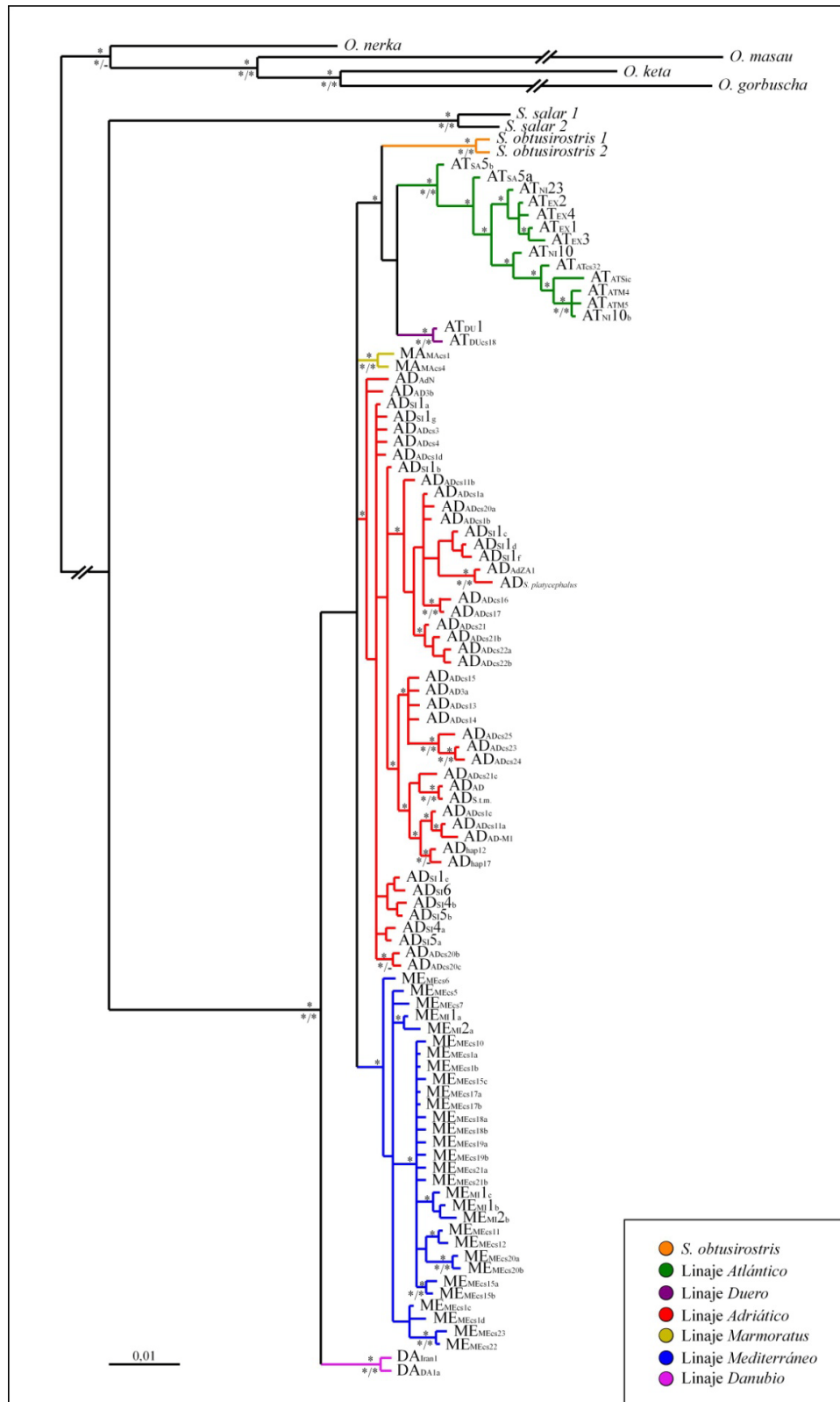


Figura V.3. Topología obtenida en el estudio comparado de las regiones D-Loop, Cyt b e ITS1 mediante el método de inferencia filogenética BI. Los valores de probabilidad posterior superiores a 0,8 se indican con un asterisco sobre las ramas del árbol. Los valores de *bootstrap* superiores a 60 obtenidos en los análisis de ML y MP se indican con un asterisco bajo las ramas del árbol.

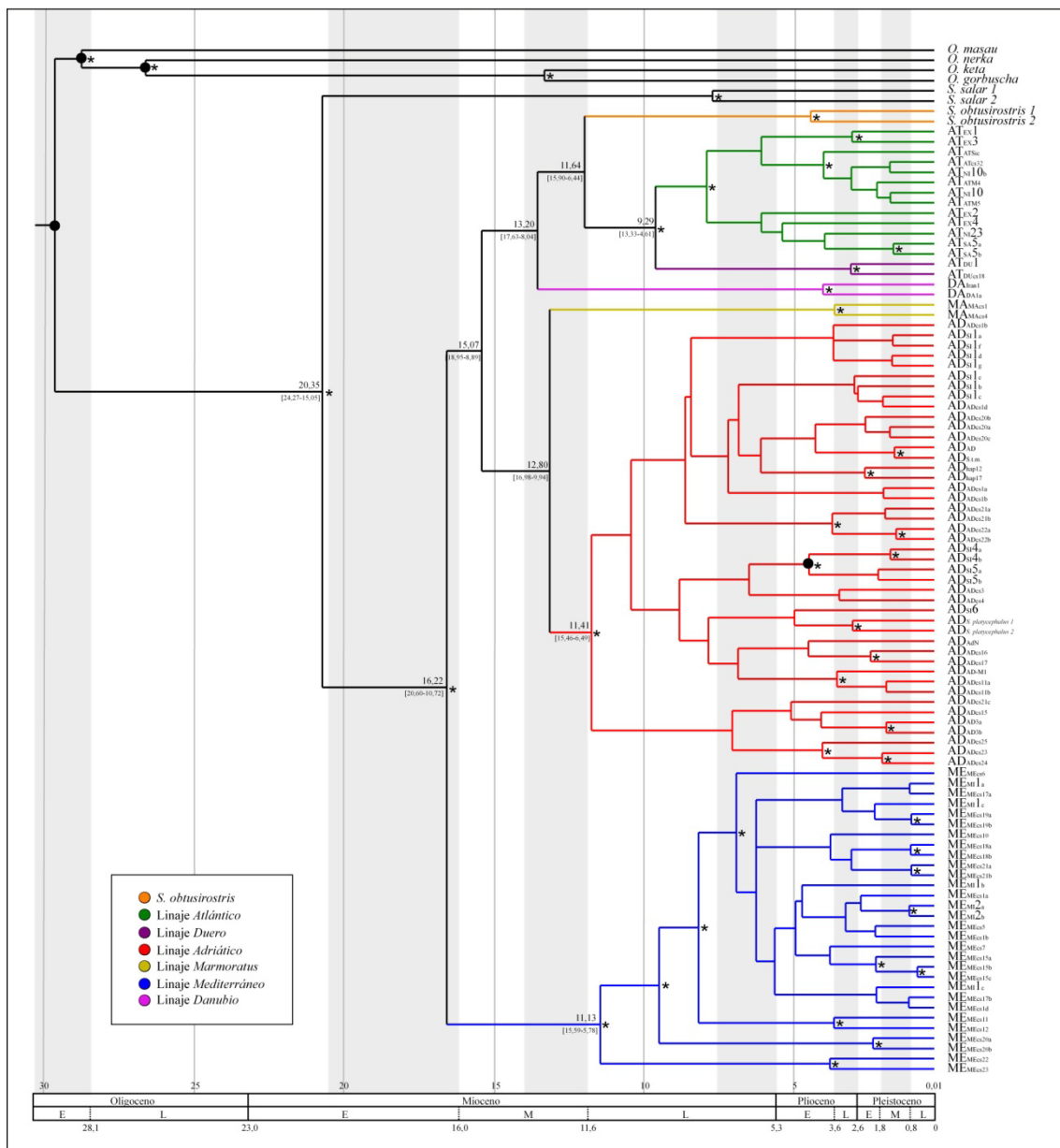


Figura V.4. Árbol ultramétrico obtenido en el estudio comparado de las regiones D-Loop, Cyt b e ITS1 mediante el método de inferencia filogenética BI. Las edades relativas de diversificación para los principales eventos evolutivos se indican sobre las ramas del árbol. Las probabilidades del 95% de los periodos de tiempo incluidos se incluyen bajo las ramas entre corchetes. Los valores de probabilidad posterior superiores a 0,8 se indican en los nodos del árbol por un asterisco.

V.3.2. Análisis filogeográficos

V.3.2.1. Redes de haplotipos

Las redes de haplotipos obtenidas para cada fragmento amplificado empleando la parsimonia estadística se muestran en las Figuras V.5 y V.6. La cantidad de cambios mutacionales permitidos con un nivel de parsimonia del 95% fue de 13 para la región D-Loop, 14 para Cyt b y 10 para el ITS1. Todas las redes obtenidas fueron bien resueltas, presentando algunas conexiones entre haplotipos o *loops* que no pudieron ser definidas aplicando los criterios de Templeton y Sing (1993). La especie *S. ohridanus* constituyó una red separada para las dos regiones mitocondriales, mientras que *S. obtusirostris* exhibió una red aislada para el gen Cyt b, por lo que para visualizar todas las conexiones existentes y no solo las parsimoniosas (Templeton *et al.* 1992) se repitió cada análisis permitiendo de 50 a 300 cambios mutacionales para las regiones D-Loop y Cyt b, respectivamente.

Las redes mitocondriales mostraron unas relaciones similares a las obtenidas previamente en los análisis filogenéticos, de tal manera que cada secuencia se agrupó según su linaje evolutivo, conectándose entre sí dentro del límite de parsimonia definido. Las especies *S. obtusirostris* y *S. ohridanus* presentaron una alta divergencia con el resto de haplotipos, separados de los más próximos por 12 y 21 pasos mutacionales para la región D-Loop y por 22 y 291 saltos mutacionales para el gen Cyt b, respectivamente. Para ambos genes, el linaje *Atlántico* muestra una red dispersa, sugiriendo una estabilidad poblacional en toda la zona atlántica. Dentro de este grupo, a nivel mitocondrial se observa una separación del linaje *Duero* del resto de secuencias *Atlánticas*, estando conectado al haplotipo más próximo por cinco y 10 pasos mutacionales para las regiones D-Loop y Cyt b, respectivamente. Con respecto a los linajes mediterráneos, cada línea evolutiva mostró grupos bien diferenciados, variando sus relaciones de proximidad genética y el número de saltos mutacionales dependiendo de la región amplificada. Los linajes *Adriático* y *Mediterráneo* exhibieron una moderada divergencia entre ellos, separándose los haplotipos más próximos por cuatro pasos mutacionales para ambas regiones mitocondriales. Cabe destacar que el gen Cyt b exhibió un patrón de estructuración más disperso, presentando conexiones no resueltas entre los linajes mediterráneos. En relación al linaje *Adriático*, los haplotipos para la región D-Loop exhibieron una distribución típica en estrella, con la secuencia de mayor frecuencia (**AD_{SI}1**) en posición central. Dentro de esta línea evolutiva, los haplotipos **AD_{SI}4** y **AD_{SI}5** presentaron de uno a dos pasos mutacionales con la secuencia ancestral **AD_{SI}1**, situándose el haplotipo de mayor frecuencia (**AD_{SI}4**) más exteriormente. Por otro lado, el haplotipo ancestral definido para la región Cyt b (**AD_{AD-II}**) presentó una distribución oriental dentro del área mediterránea, con una distancia de un salto mutacional con respecto a la secuencia de mayor frecuencia en el sur de la Península Ibérica (**AD_{SI}1**), posicionándose de manera central entre las secuencias *Adriáticas-Suribéricas*. Con respecto al linaje *Mediterráneo*, la región D-Loop exhibió una disposición en estrella, similar a la observada en la línea *Adriática*, situándose el haplotipo **ME_{MI}1** en posición central. Dentro de este linaje, los haplotipos de referencia de la Península Itálica (**ME_{MEcs22}** y **ME_{MEcs23}**) y sur de Francia (**ME_{MEcs20}**) se dispusieron más externamente a cuatro o cinco saltos mutacionales con la

secuencia **ME_{MI}1**. En relación al al gen Cyt b, el haplotipo **ME_{Mk}2** presentó una disposición más externa, separándose del haplotipo **ME_{Mk}1** por cuatro saltos mutacionales. Este número de cambios mutacionales es similar al obtenido entre los linajes *Adriático*, *Mediterráneo* y *Marmoratus*.

Finalmente, a nivel nuclear las diferencias entre linajes y haplotipos fueron menos marcadas, presentando algunas secuencias de diferentes líneas evolutivas un menor número de saltos mutacionales entre ellas que con aquellas de su mismo linaje. La red haplotípica mostró una distribución dispersa, con un número de saltos mutacionales entre secuencias muy pequeño, situándose el haplotipo ibérico de referencia **rMEDA** como la secuencia ancestral definida dentro de toda la red.

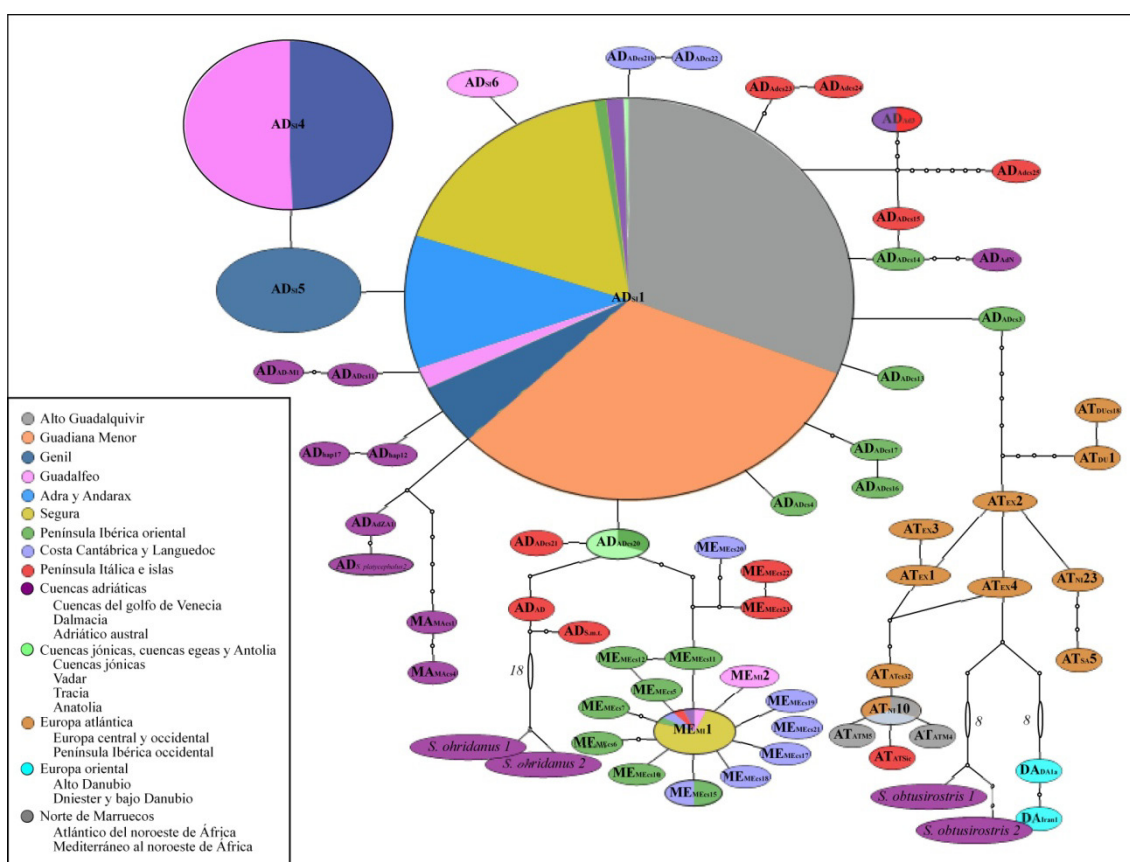


Figura V.5. Red de haplotipos obtenida en el estudio comparado de la región D-Loop empleando la parsimonia estadística. La superficie de cada elipse es proporcional al número de secuencias detectadas. Los círculos vacíos indican haplotipos intermedios no muestreados. Cada línea representa un cambio mutacional, excepto si se indica su número en la rama correspondiente. La longitud de las ramas no es informativa.

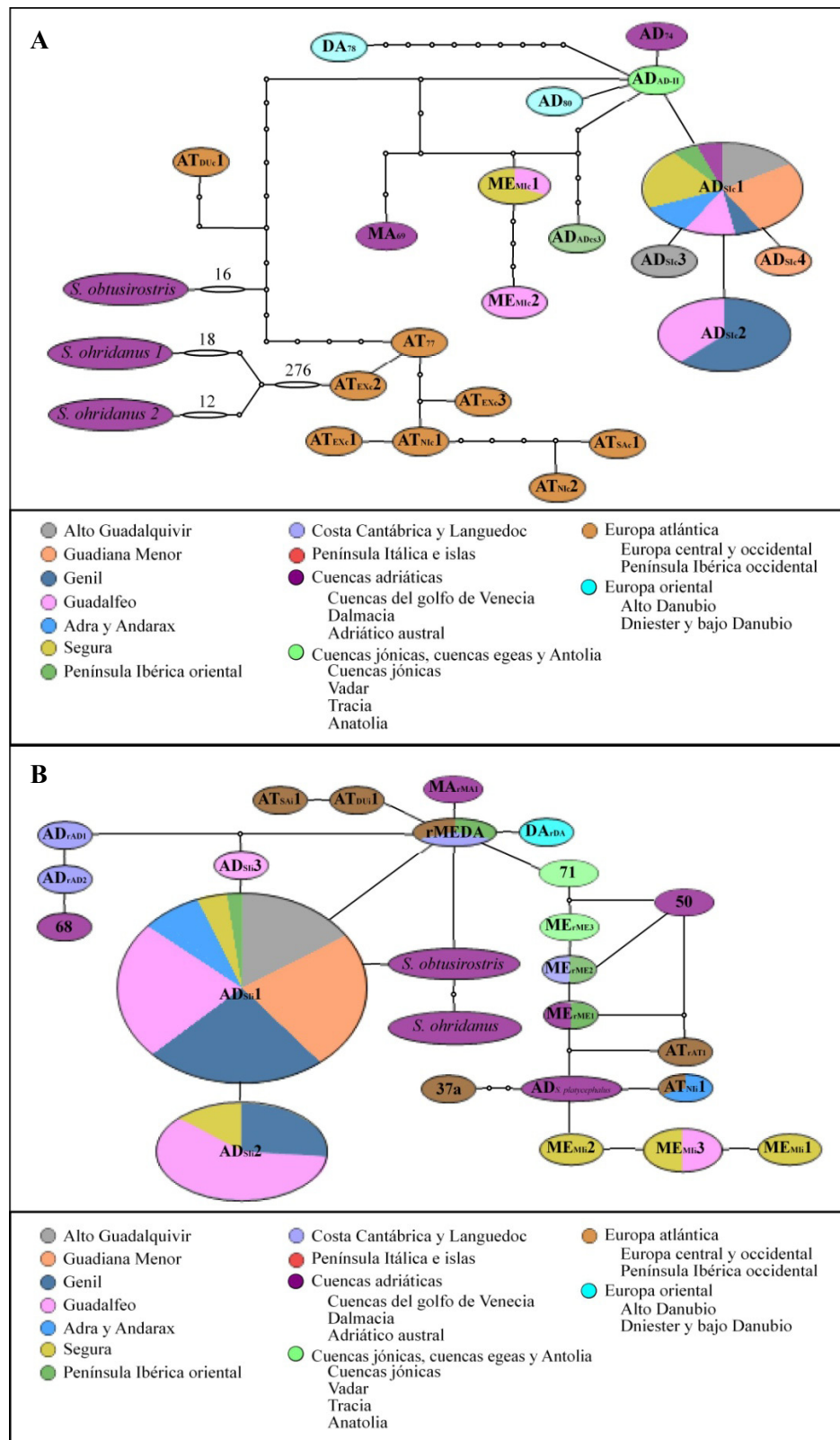


Figura V.6. Red de haplotipos obtenida en el estudio comparado de la región Cyt b (A) e ITS1 (B) empleando la parsimonia estadística. La superficie de cada elipse es proporcional al número de secuencias detectadas. Los círculos vacíos indican haplotipos intermedios no muestreados. Cada línea representa un cambio mutacional, excepto si se indica su número en la rama correspondiente. La longitud de las ramas no es informativa.

V.3.2.2. Historia biogeográfica

Las topologías obtenidas fueron congruentes con la historia paleogeográfica del área mediterránea (Figuras V.7 y V.8, Anexo VIII), sugiriendo para cada linaje varios procesos de dispersión y vicarianza que sitúan la crisis del Messiniense y las glaciaciones del Pleistoceno como los eventos más importantes en la diversificación de los linajes *Adriático* y *Mediterráneo* de la Trucha Común (Figura V.9).

La diversificación del linaje *Adriático* comenzó hace unos 11 millones de años en el Mediterráneo occidental (Figura V.7, Anexo VIII), exhibiendo un primer evento de dispersión hacia la isla de Córcega hace entre 12 y 10 millones de años (nodo 107). Los resultados sugieren 21 eventos de vicarianza, 16 de dispersión y 3 extinciones (Figura V.7), estando principalmente asociados a la historia paleogeográfica de la región mediterránea durante el Messiniense y Pleistoceno Medio y Superior. La inestabilidad geológica durante el Mioceno del mediterráneo occidental parece haber influido notablemente en la diversidad de la especie. De hecho, en este periodo se modificaron notablemente la distribución de las cuencas hidrográficas, desapareciendo, creándose y modificándose los cursos fluviales hasta su disposición actual. Este hecho, unido a los cambios paleoclimáticos del Mioceno, permitiría explicar los eventos de extinción detectados hasta el Messiniense. Durante el Mioceno, la línea *Adriática* comenzó su expansión hacia el este (nodo 104), aislándose geográficamente la región de Dalmacia (F) del área ancestral constituida por la Península Itálica (D), sur de Francia (C) y Península Ibérica (A y B) durante la crisis del Messiniense (nodo 103). Durante el Mioceno Medio se produjeron conexiones temporales entre el mediterráneo oriental y occidental, separados por el cinturón orogénico formado por los Apeninos, Sicilia y Maghrebides; explicando los eventos de dispersión detectados hacia el este en los nodos 104 (entre 11 y 8 millones de años) y 103 (entre 9 y 6 millones de años). Por otro lado, durante el Messiniense, el mediterráneo occidental (A, B, C y D) habría experimentado varios procesos de vicarianza y dispersión (nodos 98, 99 y 101), asociados a la inestabilidad tectónica de esta área y los contactos entre cursos adyacentes generados en la fase “*Lago Mare*” del Messiniense. A finales del Mioceno y principios del Plioceno, el Sistema Bético se elevó nuevamente, aislando las poblaciones suribéricas (nodo 94) hace entre 6 y 4 millones de años (Anexo VIII). Por otro lado, tras finalizar la crisis salina del Messiniense, el mediterráneo oriental y occidental vuelven a conectarse a través del mar Tirreno, permitiendo la dispersión de la especie de nuevo hacia el este (nodo 85), esta vez desde la Península Ibérica oriental (B). Durante el Pleistoceno, las variaciones climáticas del Cuaternario unidas a la elevada capacidad de dispersión de la especie y su potencial anádromo han permitido que zonas aisladas geográficamente entrasen en contacto y fueran colonizadas, observándose numerosos procesos de aislamiento geográfico y dispersión durante este periodo (Figuras V.7 y V.9). Por ejemplo, en el nodo 85 se infieren dos procesos de dispersión desde la región oriental de la Península Ibérica (B) hacia el Adriático (E, G, H, I y J) y sur de la Península Ibérica (A) seguido de varios procesos de vicarianza y dispersión durante las glaciaciones del Pleistoceno (Figura V.7). Un proceso similar se observa en el nodo 62, con un proceso de dispersión desde las cuencas del golfo de Venecia (E), seguido de un evento de

vicarianza (nodo 61) que separó esta área del sur de la Península Ibérica (A) hace aproximadamente 1,5 millones de años.

De manera similar a lo observado en el linaje *Adriático*, el origen geográfico del linaje *Mediterráneo* parece igualmente asociado al mediterráneo occidental, hace unos 11 millones de años (Figura V.8, Anexo VIII). Los resultados sugieren siete eventos de vicarianza y cuatro de dispersión (Figura V.8), estando principalmente asociados a la historia paleogeográfica de la región mediterránea a finales del Mioceno y principios del Plioceno y del Pleistoceno (Figura V.9). Hace entre 12 y 10 millones de años la línea Mediterránea sufrió un proceso de dispersión y vicarianza (nodo 63), separándose por un lado el sur de Francia (C) y las poblaciones suribéricas (A) de la Península Ibérica oriental (B) y austral (A) y Península Itálica (D). La zona interna de la Cordillera Bética-Rifeña junto con las microplacas de Córcega, Cerdeña, Calabria y Kabiliyas comenzaron a separarse en a principios del Oligoceno, situándose a mediados del Mioceno en su disposición actual. Por lo tanto, el origen común de estas ecorregiones explicaría la proximidad a las secuencias suribéricas (A) observada en los nodos ancestrales 41 y 62. De la misma manera que lo detectado en la línea *Adriática*, la inestabilidad tectónica durante el Mioceno-Plioceno y las glaciaciones del Cuaternario influyeron notablemente en la distribución de este linaje en la zona Mediterránea. Sin embargo, el amplio rango de error asociado a los nodos ancestrales de la genealogía no ha permitido asignar un evento geográfico a los procesos detectados de vicarianza y dispersión. Por ejemplo, en el nodo 62 se infiere un proceso de vicarianza entre las cuencas del sur de la Península Ibérica (A) y sur de Francia (C), seguido de un evento de dispersión en ambas áreas (nodos 44 y 54). El rango de error asociado en estos nodos abarcó entre 10 y 2 millones de años para el nodo 62 y entre 0 y 8 millones de años para los nodos 44 y 54, de tal manera que los eventos biogeográficos inferidos se solaparon en el tiempo (Anexo VIII).

Finalmente, las cuencas suribéricas mostraron numerosos procesos de colonización y expansión tanto entre ellas, más próximas geográficamente, como con otras poblaciones del mediterráneo. Para ambos linajes, las cuencas del sur de la Península Ibérica mostraron una mayor proximidad genética con las poblaciones del sur de Francia (C) y de la Península Itálica y sus islas (D) y, en menor medida, con las poblaciones más próximas situadas al este de la Península Ibérica (B) (Figuras V.8 y V.9). Cabe destacar que las cuencas del Genil y Guadalfeo presentaron dos grupos de haplotipos *Adriáticos* que evolucionaron independientemente en distintos periodos, exhibiendo patrones de colonización y posterior diversificación separados en el tiempo. Un patrón similar se encontró al comparar los tiempos de diversificación de las líneas evolutivas *Adriática* y *Mediterránea* en las cuencas del Guadalfeo y Segura, aunque resultó ser menos acusado ya que ambos linajes colonizaron y se diversificaron en estas cuencas a finales del Pleistoceno.

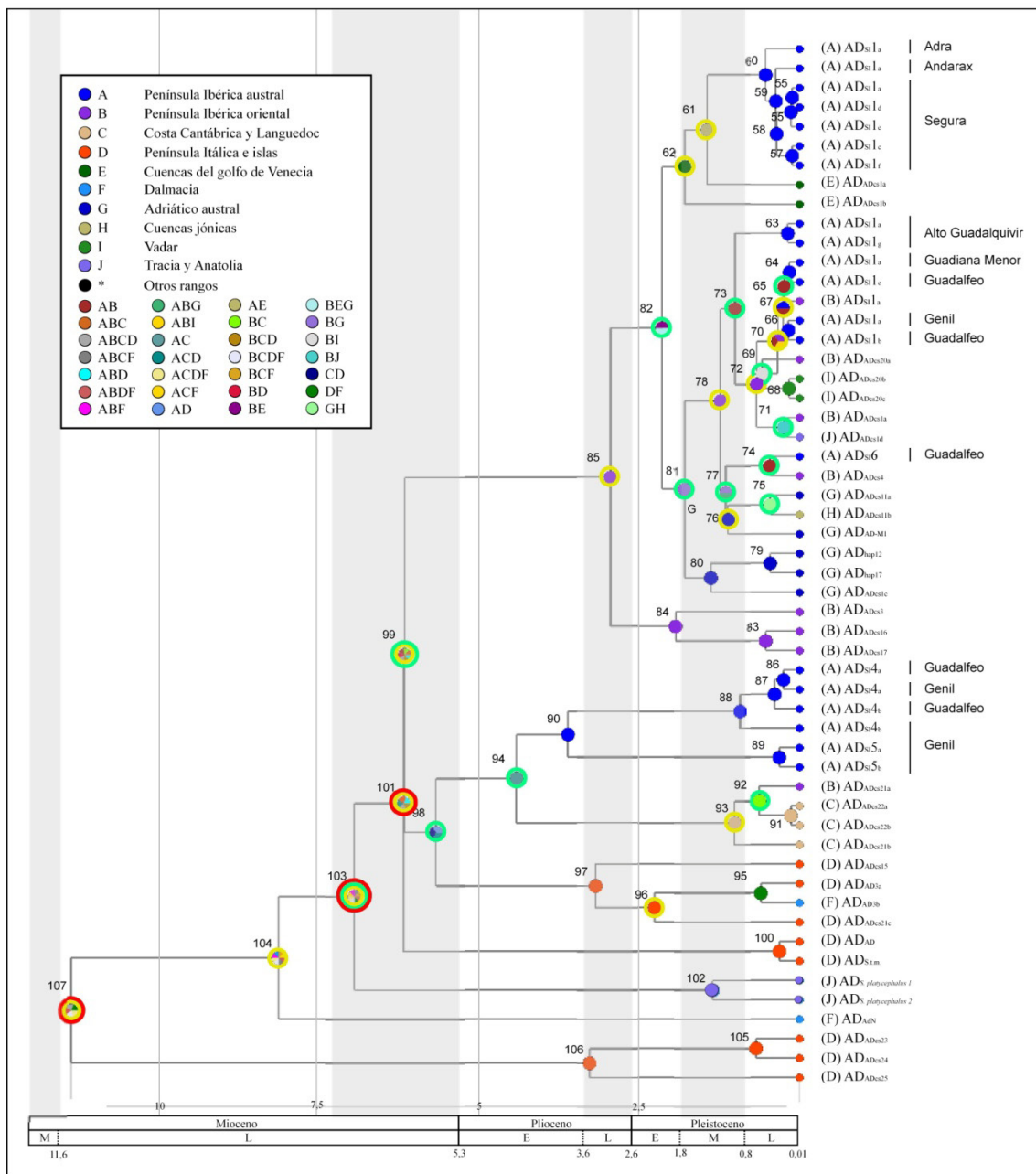


Figura V.8. Árbol ultramétrico del linaje *Adriático* obtenido en el estudio comparado de las regiones D-Loop, Cyt b e ITS1 generado mediante inferencia bayesiana con el programa *BEAST* y el análisis de áreas ancestrales *S-DIVA*. Los gráficos de los nodos muestran la probabilidad relativa de cada área ancestral encontrada. Los eventos de vicarianza, dispersión y extinción se indican sobre los nodos con círculos verde, amarillo y rojo; respectivamente. Los números mostrados sobre los nodos indican el código asignado a cada nodo en el texto. Las ecorregiones empleadas en este análisis se indican en la leyenda.

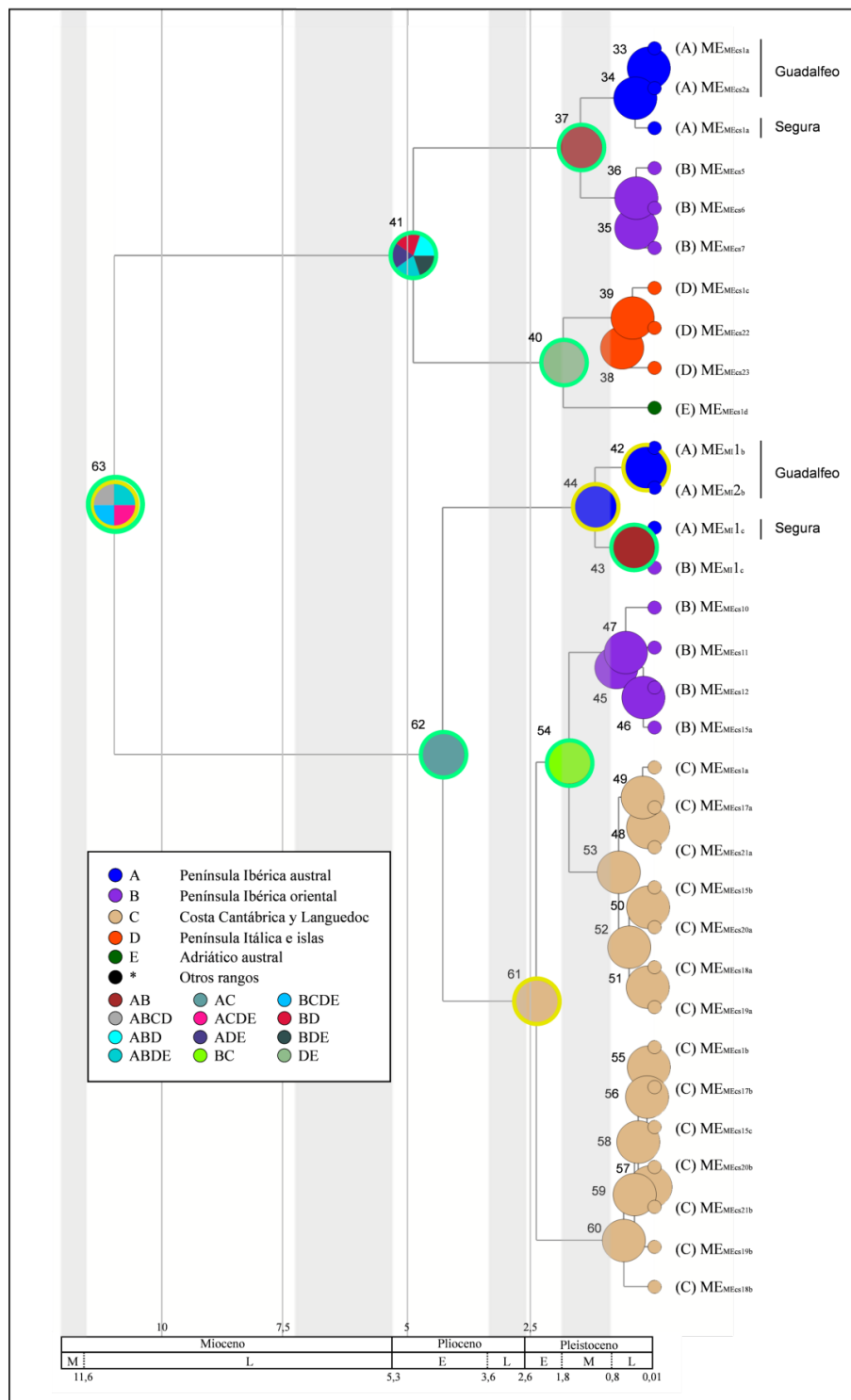


Figura V.8. Árbol ultramétrico del linaje *Mediterráneo* obtenido en el estudio comparado de las regiones D-Loop, Cyt b e ITS1 generado mediante inferencia bayesiana con el programa *BEAST* y el análisis de áreas ancestrales *S-DIVA*. Los gráficos de los nodos muestran la probabilidad relativa de cada área ancestral encontrada. Los eventos de dispersión, vicarianza y extinción se indican sobre los nodos con círculos amarillo, verde y rojo; respectivamente. Los números mostrados sobre los nodos indican el código asignado a cada nodo en el texto. Las ecorregiones empleadas en este análisis se indican en la leyenda.

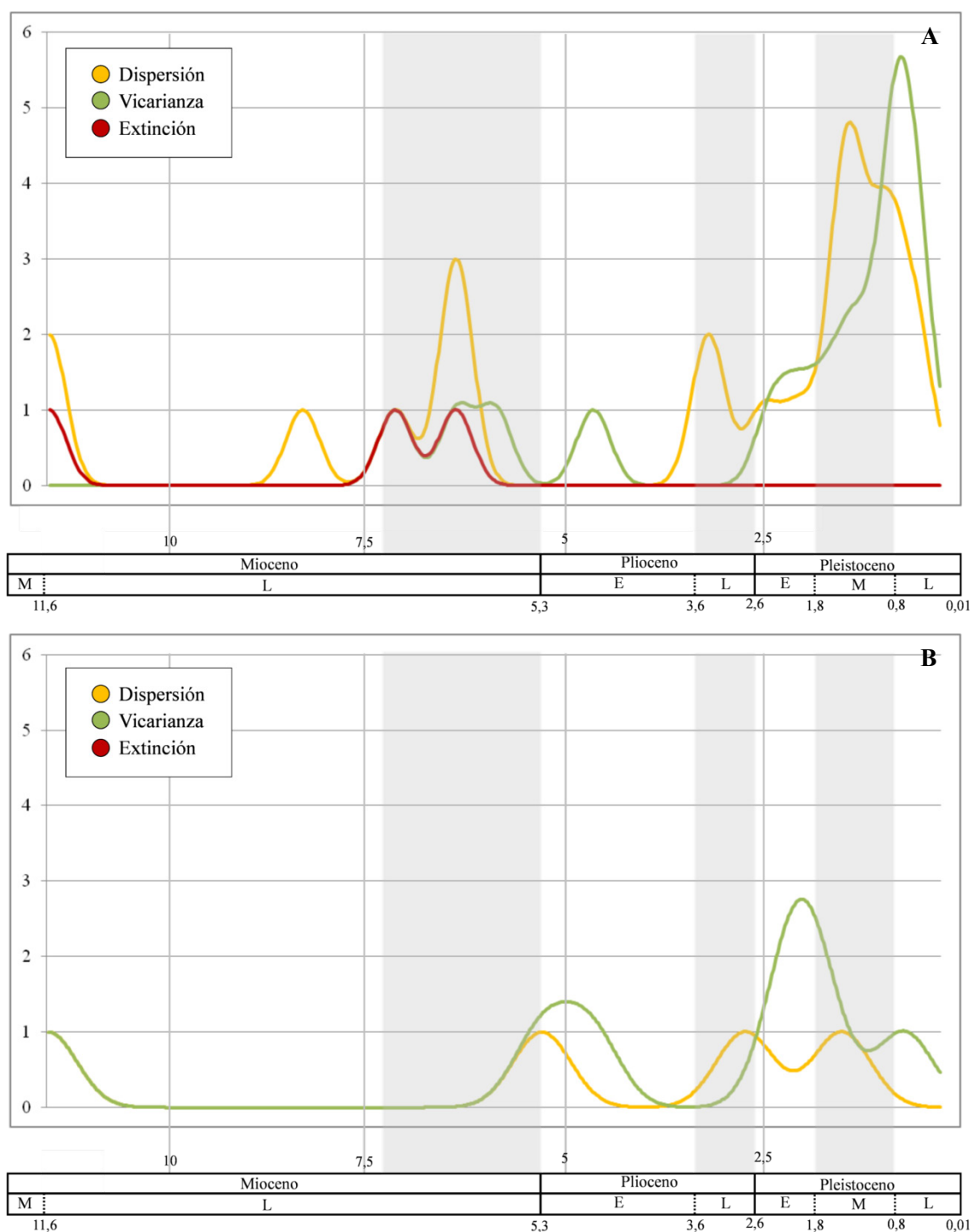


Figura V.9. Representación gráfica del número de eventos de dispersión, vicarianza y extinción encontrados en cada periodo de tiempo para los linajes *Adriático* (A) y *Mediterráneo* (B) empleando una distribución normal en cada nodo del árbol obtenido.

V.3.3. Estructuración poblacional

A nivel mitocondrial, los niveles de diferenciación genética en el sur de la Península Ibérica fueron muy elevados ($F_{ST} = 0,456$, $p < 0,001$), oscilando entre cero entre las cuencas del Alto Guadalquivir, Guadiana Menor, Adra y Andarax, y 0,708 ($p < 0,001$) entre el Alto Guadalquivir y Genil (Anexos IV). Se encontró una diferenciación mayor al comparar los ríos de estudio ($F_{ST} = 0,930$, $p < 0,001$), variando entre cero y uno en función de los cursos fluviales comparados (Anexos IV). Por otro lado, los niveles de diferenciación genética nuclear entre las cuencas fueron moderados ($R_{ST} = 0,106$, $p < 0,001$), oscilando entre cero entre las cuencas del Alto Guadalquivir y Andarax, y 0,265 entre las cuencas del Genil y Segura (Anexo IV). De la misma manera, la comparación de los ríos por pares (Anexo IV) indicaron también la existencia de una estructura poblacional alta y significativa ($R_{ST} = 0,338$, $p < 0,001$). De esta forma, los valores de R_{ST} variaron entre -0,026 ($p > 0,05$) en el río Aguasmulas y arroyo del Pueblo, y 0,922 ($p < 0,001$) entre los ríos Alhorí y Poqueira. Los altos valores de F_{ST} y R_{ST} indicaron la existencia de una estructura poblacional alta y significativa en el sur de la Península Ibérica, poniendo de manifiesto la ausencia de flujo génico entre sus cuencas y ríos.

En relación a los análisis de PCA, la primera coordenada explicó un alto porcentaje de la variabilidad encontrada a nivel de cuenca (77%) y un porcentaje medio a nivel de río (60%). Este eje distribuyó a las poblaciones según la frecuencia de los haplotipos **AD_{SI}1** y **AD_{SI}4**, separando, salvo excepciones, las cuencas del Genil y Guadalfeo de resto de cuencas suribéricas (Figura V.10). La variabilidad explicada por la segunda coordenada fue inferior (18-19%), destacando la variabilidad existente entre los ríos de las cuencas del Genil y Guadalfeo. Al agrupar los ejemplares por sus cuencas de origen, esta coordenada separó la cuenca del Segura del resto de cuencas incluidas (Figura V.10). A nivel nuclear se observó una variabilidad explicada aceptable por parte de la primera coordenada, tanto a nivel de cuenca (66%) como de río (53%). La distribución a un lado u otro de este eje fue determinada, principalmente, por la variación alélica encontrada en los loci Ssa85, Ssa197 y BFRO 002, ya que en estos loci se observó una variabilidad superior al 60%. La gran cuenca del Guadalquivir mostró un patrón de dispersión similar al obtenido en el Capítulo IV de esta Tesis, separando esta coordenada las cuencas del Alto Guadalquivir, Genil y Adra del resto de cuencas suribéricas. Salvo excepciones, el patrón observado a nivel de ríos fue similar, agrupándose las poblaciones según su cuenca de origen. Sin embargo, los ríos del Alto Guadalquivir y Guadalfeo no pudieron ser agrupados conjuntamente, distribuyéndose a ambos lados del punto de origen. La variabilidad explicada por la segunda coordenada fue inferior, tanto en el análisis a nivel de cuenca (29%) como a nivel de río (19%). Las poblaciones se distribuyeron principalmente según las frecuencias alélicas detectadas en los loci Str60, Str73 y SSOSL438, mostrando estos microsatélites una variación superior al 30% en este eje. Esta coordenada separó las cuencas del Adra y Andarax del resto de cuencas suribéricas. Al analizar los resultados a nivel de río, se observó una separación entre las cuencas del Guadalfeo y las cuencas del Alto Guadalquivir, Adra y Andarax. Sin embargo, los ríos del Guadiana Menor, Genil y Segura no pudieron ser agrupados, distribuyéndose sus ríos a lo largo de toda esta segunda coordenada.

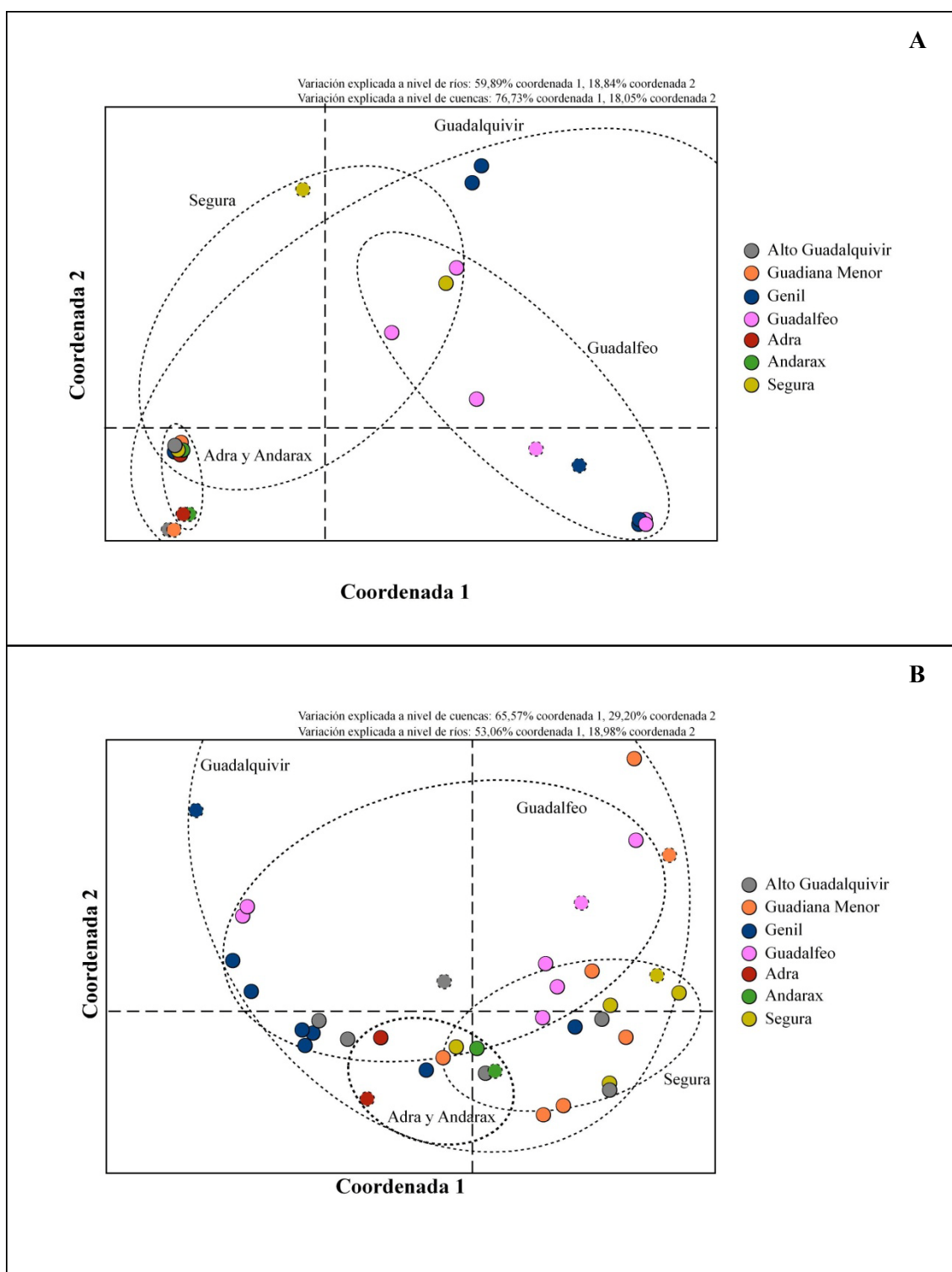


Figura V.10. PCA basados en las matrices de distancias genéticas F_{ST} (A) y R_{ST} (B) entre las cuencas (círculos punteados) y ríos analizados en el sur de la Península Ibérica.

La estructuración observada entre los ríos estudiados se ha resumido en varios fenogramas, contruidos a partir de las matrices de distancias F_{ST} y R_{ST} , y el método de agrupamiento de NJ (Figuras V.11 y V.12). A nivel mitocondrial los ríos se agruparon según los haplotipos compartidos, observándose próximos en el fenograma algunos ríos geográficamente lejanos entre sí (Figura V.11). El fenograma muestra un primer conjunto de ríos formado por aquellos cursos que presentan el haplotipo nativo **AD_{SI}1**. El río Lanjarón constituye un segundo grupo próximo al anterior, presentando en su curso el haplotipo **AD_{SI}6**, único y exclusivo de este río. Un tercer grupo incluiría aquellos ríos que mostraron el haplotipo nativo **AD_{SI}4**, agrupando a las cuencas del Genil y Guadalfeo. El río Torrente forma un grupo separado y próximo al anterior, mostrando sus ejemplares los haplotipos mitocondriales **AD_{SI}4** y **AD_{SI}1**. Los dos últimos conjuntos de ríos incluyeron al Dilar y Cacín, con el haplotipo **AD_{SI}5** distribuido homogéneamente, y a los ríos Chico de Soportújar y Tus que exhibieron los haplotipos de la línea nativa *Mediterránea-Ibérica* **ME_{MI}1** y **ME_{MI}2**.

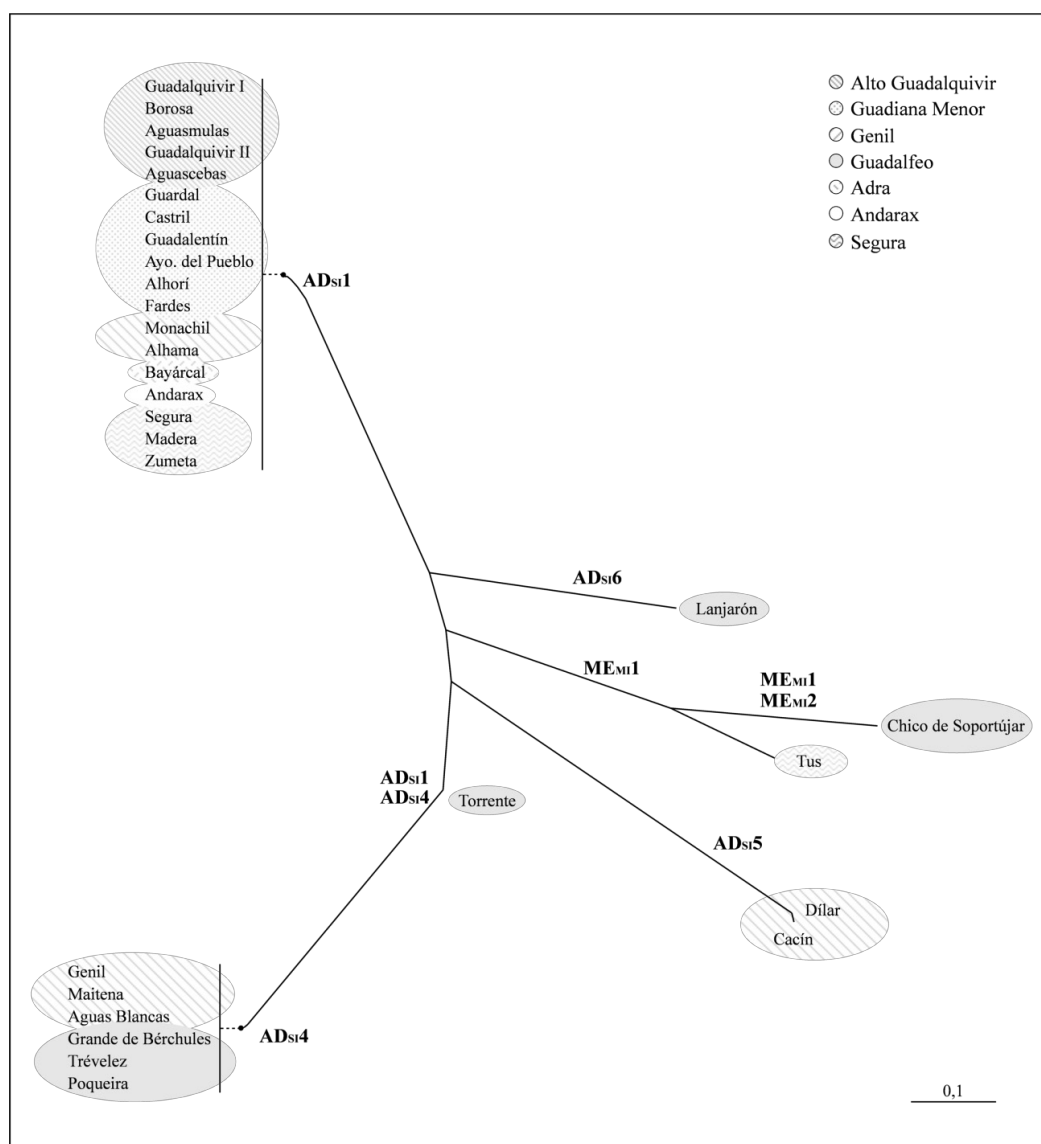


Figura V.11. Fenograma basado en la matriz de distancias genéticas y el análisis de NJ para la región D-Loop entre las localidades analizadas en el sur de la Península Ibérica.

Por otro lado, a nivel nuclear los fenogramas de NJ obtenidos empleando las matrices de distancias genéticas D_A y D_C , presentaron topologías similares, observándose un mayor soporte y longitud de ramas a partir de la matriz de distancias de Cavalli-Sforza (Figura V.12). A grandes rasgos, los ríos se agruparon según su origen hidrográfico, observándose algunos ríos más próximos a cursos de otras cuencas que a los más próximos geográficamente. De esta manera, los ríos del sur de la Península Ibérica se agruparon en cuatro grandes grupos. En primer lugar, las cuencas del Alto Guadalquivir, Guadiana Menor, (salvo los ríos Guardal, Castril y Alhorí) y las cuencas del Adra y Andarax, formaron un primer grupo diferenciado. Por otra parte, la cuenca del Genil (excepto el río Monachil, el río Castril del Guadiana Menor y los ríos Trévez y Poqueira del Guadalfeo) constituyeron el segundo grupo, mientras que la cuenca del Guadalfeo, exceptuando el Trévez y Poqueira, junto con los ríos Guardal y Alhorí del Guadiana Menor se dispusieron en un tercer grupo. Finalmente, la cuenca del Segura constituyó el cuarto grupo diferenciado.

Según los resultados obtenidos a nivel poblacional se construyó un fenograma a partir de la matriz de distancia genética D_C entre individuos (Figura V.13). Los ríos suribéricos mostraron un patrón de estructuración hidrográfico similar al obtenido previamente (Figura V.12), con algunas puntualizaciones generadas por la presencia de ejemplares de distintos orígenes o con genotipos compartidos entre cuencas o ríos. De hecho, el nivel de mezcla genética fue considerable, presentando algunos nodos con ejemplares de orígenes hidrográficos distintos. De esta manera, los ríos Genil, Fardes y Torrente presentaron ejemplares próximos a otros cursos fluviales, de tal forma que sus individuos no se agruparon en un nodo común a nivel de río. La estructuración observada dentro del Genil no pareció ser causada por la diferenciación entre sus localidades sino por su propia variabilidad intrapoblacional, presentando algunos individuos menor divergencia con las localidades del Aguas Blancas y Dilar, o con los ríos Maitena, Trévez y Poqueira. Un caso similar fue observado en el río Fardes, mostrando algunas truchas una mayor cercanía al río Alhorí, mientras que otras se agruparon próximas a la cuenca del Alto Guadalquivir, Adra y Andarax. Finalmente, el río Torrente mostró un patrón de estructuración más complejo y una alta diferenciación entre sus localidades. Por un lado, la localidad más baja del río (TO2) se agrupó con el río Grande de Bérchules. Por otro lado, la localidad de cabecera (TO1) presentó algunos individuos con una mayor proximidad genética con el río Guardal, mientras que otros se agruparon con los ríos Chico de Soportújar y Lanjarón, pertenecientes a la misma cuenca.

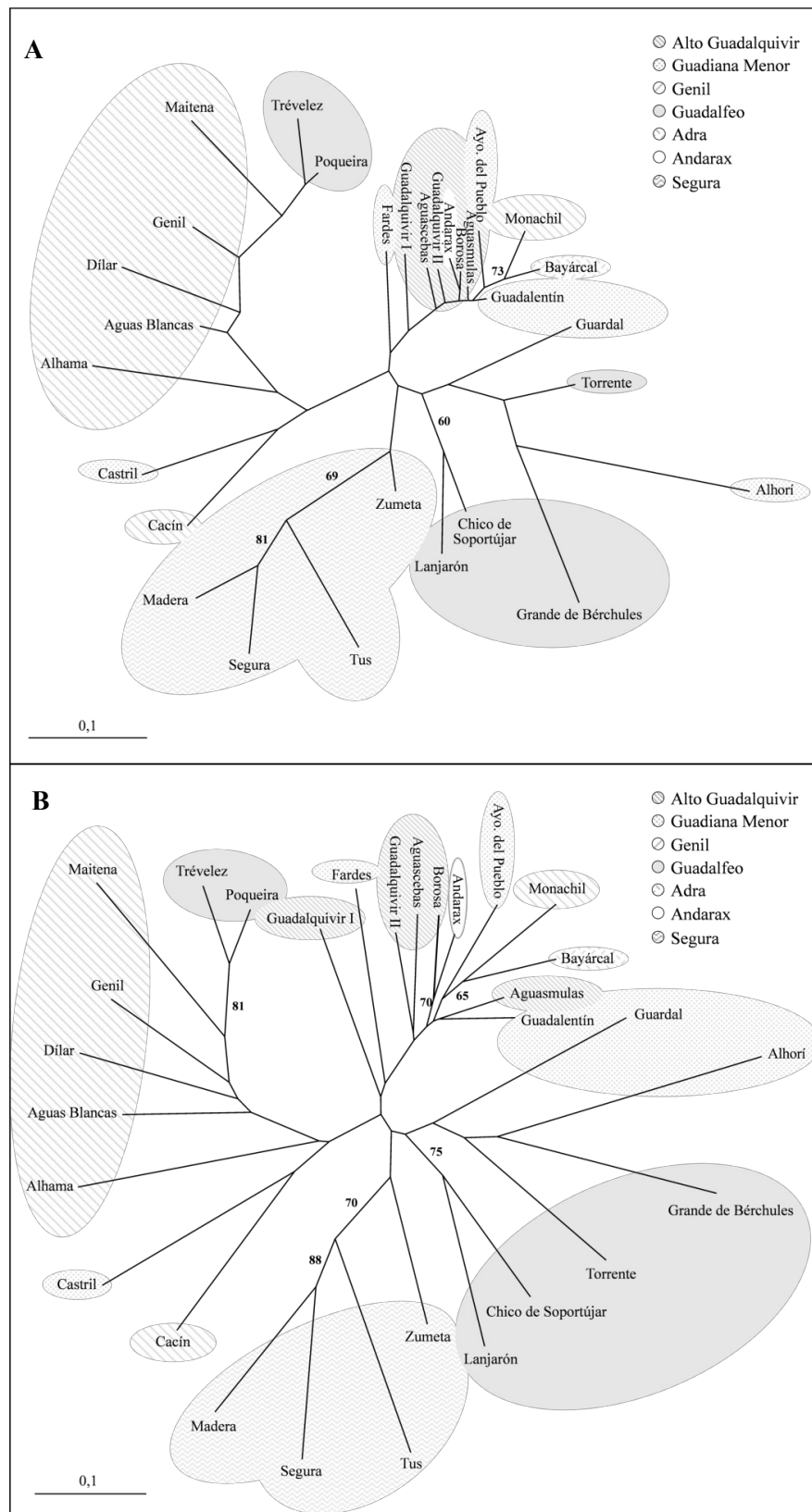


Figura V.12. Fenogramas basados en las matrices de distancias genéticas de Nei (**A**) y Cavalli-Sforza (**B**) y el método de agrupamiento de NJ para el análisis de loci microsatélites en los ríos suribéricos.

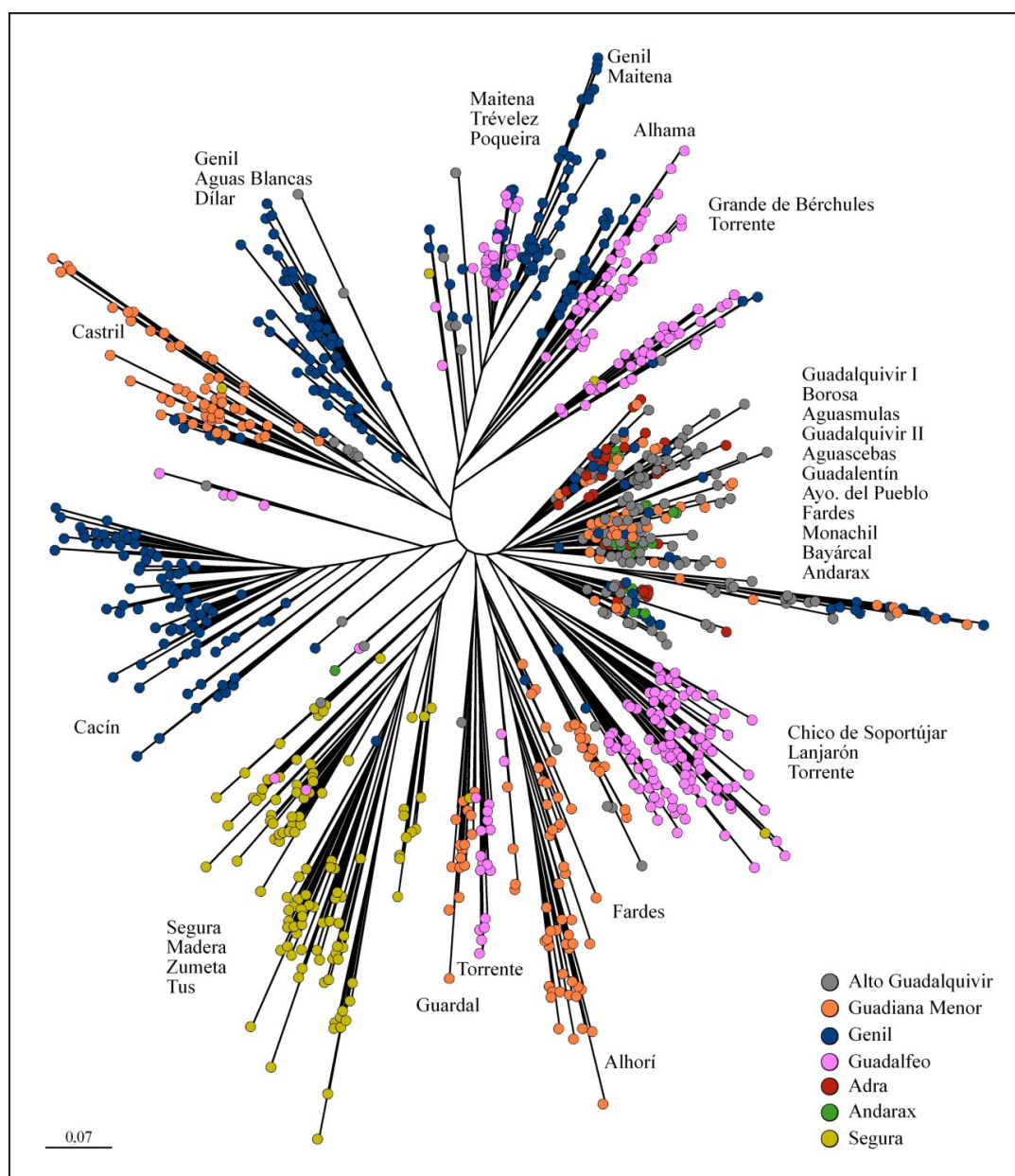


Figura V.13. Fenograma basado en la matriz de distancias genéticas de Cavalli-Sforza y el análisis de *NJ* para los loci microsatélites en los ejemplares analizados en el sur de la Península Ibérica.

En los ríos suribéricos se observó una estructuración genética constituida por 10 poblaciones parentales o grupos ($K=10$) (Figuras V.14 y V.15). Estas poblaciones parentales no pudieron asociarse a unidades hidrográficas de cuenca sino que se asociaron a ríos o conjunto de ríos diferenciados, algunos de ellos situados en cuencas diferentes. Cabe destacar que el 43% de los ríos mostraron proporciones de su genoma superiores del 20% de al menos dos poblaciones parentales. De esta manera, todos los ríos de la cuenca del Alto Guadalquivir, con la excepción del Guadalquivir I, junto con los ríos Guadalentín, arroyo del Pueblo, Monachil, Zumeta y Tus formarían un primer grupo diferenciado y definido por los grupos 1 y 2. Por otro lado, el río Castril constituiría un segundo grupo diferenciado debido a la presencia mayoritaria del grupo

3, mientras que los ríos Alhorí y Fardes formarían un tercer grupo aislado, definido por el grupo 4. El grupo 5 relacionaría las cuencas del Genil y Guadalfeo, mostrando una frecuencia superior al 40% en los ríos Genil, Dílar, Alhama y Grande de Bérchules. Por otra parte, las truchas analizadas en los ríos Trévez, Poqueira y Maitena constituyeron un quinto grupo definido por el grupo 6, el río Cacán un sexto grupo (grupo 7), mientras que el grupo 8 englobaría a los ríos Lanjarón y Chico de Soportújar. Finalmente, el grupo 9 relacionó las cuencas del Adra y Andarax con los ríos Segura y Madera, mientras que el río Torrente constituyó otro grupo diferenciado, asignado al grupo 10. Los ríos Guadalquivir I, Guardal y Aguas Blancas no pudieron ser asignados a ninguno de estos grupos diferenciados, presentando porciones del genoma con diferentes orígenes parentales (Figura V.15).

Según estos resultados los grupos 1 y 2 son característicos de las cuencas del Alto Guadalquivir (80,5%), Guadiana Menor (40,5%) y Segura (55%); presentando una frecuencia inferior en la cuenca del Genil (19%). Los grupos 3 y 4 definirían a la cuenca del Guadiana Menor, con una proporción media global de 21 y 26%, respectivamente. Los grupos 5 y 6 relacionarían la cuenca del Genil con la cuenca del Guadalfeo, que presentaron proporciones medias para el grupo 5 del 32 % y 15%, respectivamente, y del 24% y 33% para el grupo 6. La cuenca del Genil constituiría un grupo diferenciado definido por el grupo 7, presente en baja frecuencia (14%), mientras que la cuenca del Guadalfeo mostró una proporción media intermedia asignada al grupo 8 (24%). El grupo 9 conectaría las cuencas del Segura (34%) con el Adra (89%) y Andarax (79%). Finalmente, el grupo 10 sería característicos de las cuencas del Guadalfeo y Andarax, aunque con frecuencias bajas en ambos (19% y 12%, respectivamente).

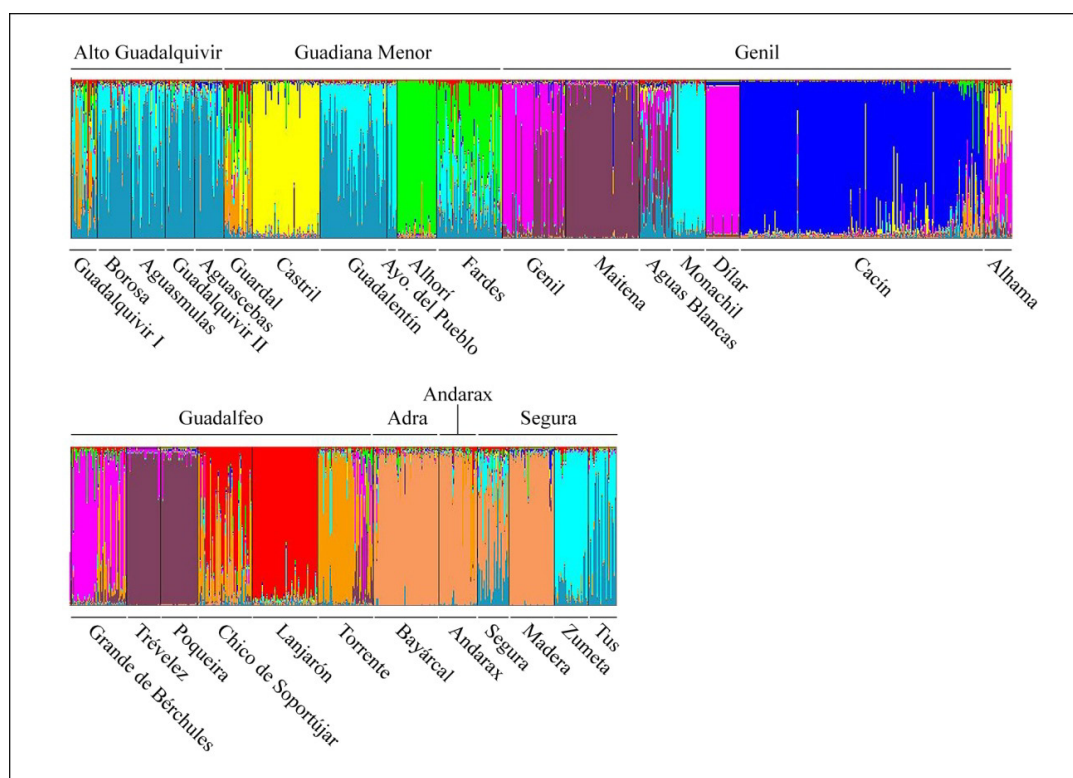


Figura V.14. Estructura genética estimada para $K=10$ obtenida por el programa *STRUCTURE* y validada con el test de Evanno en el sur de la Península Ibérica.

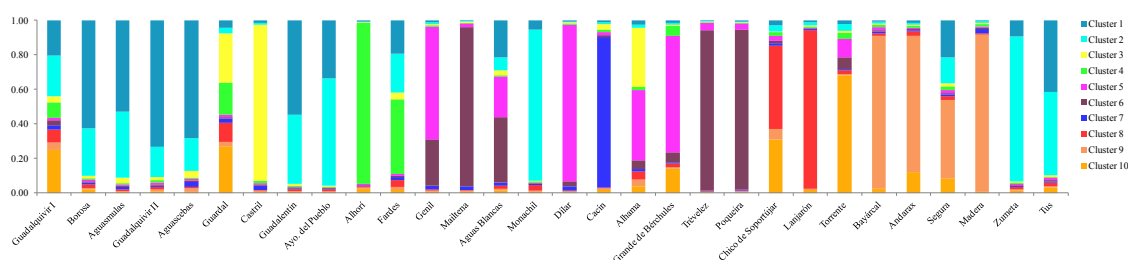


Figura V.15. Proporción media de cada grupo ($K=10$) entre los ríos suribéricos.

Finalmente, los resultados del análisis de AMOVA (Tabla V.2) a nivel mitocondrial mostraron diferencias significativas a todos los niveles jerárquicos. Descartando las diferencias entre haplotipos, el 65% de la variación genética encontrada fue debida a las diferencias entre los ríos, mientras que el 28,5% pudo explicarse por las divergencias existentes entre las cuencas. El alto nivel de estructuración detectado ($\Phi_{ST} = 0,933$, $p < 0,001$) se relacionó tanto con los patrones hidrológicos entre ríos ($\Phi_{SC} = 0,906$, $p < 0,05$), como con la variación existente entre las cuencas ($\Phi_{CT} = 0,285$, $p < 0,05$). A nivel nuclear, los resultados mostraron una mayor diferenciación entre ríos (32%) que entre cuencas (4%). De hecho, el alto nivel de estructuración detectado ($\Phi_{ST} = 0,284$, $p < 0,001$) se encontró relacionado con los patrones hidrológicos de los ríos ($\Phi_{SC} = 0,252$, $p < 0,001$) y no con la variación existente entre las cuencas analizadas ($\Phi_{CT} = 0,043$, $p > 0,05$).

Tabla V.2. Análisis de la varianza molecular estimada mediante AMOVA entre las localidades analizadas en el sur de la Península Ibérica (g.l.: grados de libertad).

	Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Φ	p
Mitocondrial	Dentro de ríos	382	19,375	0,051	6,70	0,933 (Φ_{ST})	< 0,001
	Entre ríos	23	148,328	0,491	64,80	0,906 (Φ_{SC})	< 0,001
	Entre cuencas	6	119,191	0,216	28,50	0,285 (Φ_{CT})	< 0,050
	Total	411	286,894	0,757			
Nuclear	Dentro de ríos	2598	231111,193	88,957	71,57	0,284 (Φ_{ST})	< 0,001
	Entre ríos	23	59861,224	29,969	32,18	0,252 (Φ_{SC})	< 0,001
	Entre cuencas	6	28172,842	5,3667	4,32	0,043 (Φ_{CT})	> 0,050
	Total	2627	319145,259	124,293			

V.4. DISCUSIÓN

Los datos genéticos pueden contribuir a entender como han influido los procesos pasados y/o más recientes sobre la evolución y estructura genética observada actualmente en una especie (Avice 2004). Los resultados obtenidos en los análisis genéticos poblacionales, filogenéticos y filogeográficos han revelado una compleja historia evolutiva para la especie, evidenciando procesos de dispersión, vicarianza, extinción y contactos secundarios, modelados no solo por su historia paleogeográfica, sino por también por eventos de migración y colonización poblacional, unidos a procesos de fragmentación más actuales. Los resultados obtenidos mostraron una elevada estructuración poblacional, presentando algunas discrepancias entre los marcadores empleados debidas a su mayor o menor resolución para distinguir genealogías más recientes o antiguas.

V.4.1. Variación y divergencia genética

Las características del genoma mitocondrial, entre ellos su alta tasa de mutación, lo hacen particularmente útil en estudios filogenéticos (Avice 2004). Sin embargo, los haplotipos de ADN mitocondrial registran la historia matrilineal de los eventos mutacionales, limitando las inferencias obtenidas a la hora de reconstruir la historia evolutiva de las especies, linajes y poblaciones (Avice 2004). En relación a la Trucha Común, desde un punto de vista taxonómico la relación entre los linajes mitocondriales no se encuentran actualmente definidas. Por lo tanto, el uso combinado de marcadores mitocondriales y nucleares ha permitido una detección más precisa de las posibles diferencias filogenéticas y genealógicas existentes.

Las divergencias genéticas medidas en porcentaje de cambios nucleotídicos entre todas las líneas evolutivas oscilaron entre 0,3 y 1,6%, con un valor medio de 0,8%. Estos valores se encuentran dentro del rango encontrado en otros estudios en Europa (entre otros: 0,16-1,92%, Bernatchez *et al.* 1992; < 1,43%, Bernatchez y Osinov 1995; 0,21-3,43%, Apostolidis *et al.* 1996; 0,17-2,31%, Apostolidis *et al.* 1997; 0,16-1,1%, Aurelle y Berrebi 2001; 0-1,93%, Bernatchez 2001; 0,17-1,23%, Presa *et al.* 2002; 0,35-1,94, Maric *et al.* 2006) y en análisis previos en la Península Ibérica (entre otros: 0,37-3,07%, Machordom *et al.* 2000; 0-1,6%, Suárez *et al.* 2001, 0,1-1,5%, Presa *et al.* 2002; 0,8%, Cortey *et al.* 2004; 0,1-1,3%, Vera *et al.* 2010a; 0,1-0,8%, Vera *et al.* 2013). El grado de divergencia que se observa entre los linajes mediterráneos (0,8, rango 0,27-4,27%) fue similar al detectado entre las líneas atlánticas, (*Atlántica* y *Duero*; 0,9%, rango 0,6-1%), aunque el rango de divergencia es superior en el área mediterránea. Los valores observados fueron inferiores a los detectados en otros peces de agua dulce, lo que sugiere una diversificación reciente de la especie.

Debido a sus altas tasas de sustitución, la región ITS1 ha sido utilizada en estudios filogenéticos en salmónidos (entre otros: Pleyte *et al.* 1992, Crespi y Fulton 2004, Crête-Lafrenière *et al.* 2012), sin que la Trucha Común sea una excepción (Presa *et al.* 2002, Vera *et al.* 2011). El fragmento ITS1 presentó en esta especie unos valores de divergencia (0,7%, rango 0-1,4%) ligeramente inferiores a los observados a partir del ADN mitocondrial, situándose

dentro del rango encontrado por Presa *et al.* (2002) a nivel europeo (0,1-1,5%). La divergencia genética observada dentro de la especie debería ser lo suficiente elevada para ser filogenéticamente informativa, al menos entre los principales linajes matriarcales. De hecho, un alto nivel de divergencia está generalmente asociado con un alto nivel de variación genética. Sin embargo, se encontró una elevada similitud entre las secuencias comparadas. La región ITS1 puede repetirse varios cientos de veces en el genoma y sufrir una rápida evolución concertada, lo que homogeniza la variabilidad dentro del propio individuo (Page y Holmes 2009). La evolución concertada permite que los genes evolucionen juntos, complicando mucho los análisis filogenéticos ya que dificulta la distinción entre secuencias homólogas. Además, las divergencias genéticas observadas no tienen por qué corresponder a un evento de especiación o diferenciación, sino que pueden deberse a un proceso de conversión génica y/o a un sobrecruzamiento desigual (Page y Holmes 2009). A pesar de ello, en esta Tesis el empleo de la región ITS1 ha permitido diferenciar relaciones evolutivas entre y dentro de los linajes *Adriático* y *Mediterráneo*, por lo que aunque las inferencias realizadas deben ser tomadas con precaución, no deberían descartarse los resultados obtenidos, especialmente a nivel de intra linaje. Finalmente, cabe destacar que en las muestras ibéricas amplificadas no se ha encontrado ningún haplotipo de los definidos por Presa *et al.* (2002), por lo que la variabilidad de este fragmento tanto a nivel ibérico como europeo debería ser revisada.

V.4.2. Inferencia filogenética

La alta variabilidad fenotípica y genética que presenta la Trucha Común ha generado un continuo debate acerca de su clasificación taxonómica. Teniendo en cuenta los datos genéticos, los representantes del género *Salmo*, con la excepción de *S. salar*, se incluyen generalmente dentro del complejo *S. trutta*, definido por Bernatchez (2001) y autores posteriores, en uno de sus seis linajes evolutivos. Sin embargo, a pesar de existir un consenso sobre la existencia de estas líneas evolutivas, las relaciones entre ellas aún no se encuentran bien definidas, obteniéndose diferentes resultados dependiendo del marcador o marcadores empleados. Por ejemplo, la topología de los árboles generados a partir de la región Cyt b en esta Tesis muestra la situación ancestral de la línea *Atlántica* descrita por Giuffra *et al.* (1994), Bernatchez (2001) y Pustovrh *et al.* (2014) sobre los linajes *Danubio* y mediterráneos. Por otro lado, la región D-Loop y la matriz de secuencias concatenadas coincide con los estudios de Bernatchez *et al.* (1992), Suárez *et al.* (2001), Cortey *et al.* (2004) y Griffiths *et al.* (2009b), que sitúan la línea *Danubio* como un linaje ancestral en lugar de la *Atlántica*, apoyando así la idea comúnmente aceptada del origen Asiático o Ponto-Cáspico de los peces continentales europeos. Finalmente, en otros casos los linajes *Atlántico* y *Danubio* constituyeron un grupo monofilético, hermano del resto de líneas mediterráneas (Maric *et al.* 2006, Snoj *et al.* 2009). Por otro lado, las relaciones filogenéticas entre los linajes mediterráneos son igualmente desconocidas. En unos casos se ha observado un origen monofilético para los linajes *Adriático* y *Mediterráneo*, situándose *Marmoratus* como ancestral (Cortey *et al.* 2004, Snoj *et al.* 2009), mientras que en otros supuestos los tres linajes mediterráneos se dispusieron en forma de cascada, posicionándose basalmente en algunos casos la línea *Adriática* (Bernatchez 2001), y en otros el linaje *Mediterráneo* (Apostolidis *et al.* 1997, Susnik *et al.* 2006). El trabajo publicado

recientemente por Pustovrh *et al.* (2014) empleando 22 loci nucleares ha disminuido la incertidumbre filogenética existente dentro del género *Salmo*, apoyando la existencia de, al menos, cinco unidades genéticas distintas: *S. salar*, *S. ohnidanus*, *S. obtusirostris*, *S. marmoratus* y resto de linajes de *S. trutta*. Sin embargo, el soporte de las líneas asignadas como *S. trutta* no fue muy elevado, y las relaciones entre las especies *S. obtusirostris*, *S. marmoratus* y *S. trutta* no pudieron ser resueltas. Dentro de la Trucha Común, Pustovrh *et al.* (2014) observaron una separación clara entre los linajes atlánticos (*Atlántico* y *Duero*) y mediterráneos (*Adriático* y *Mediterráneo*).

El nivel de resolución obtenido a partir de los análisis filogenéticos ha reafirmado la monofilia de los linajes definidos para la especie. Además, los marcadores empleados son suficientemente polimórficos e informativos para establecer los tiempos de divergencia de las principales líneas evolutivas. Sin embargo, los resultados no han aportado nueva luz en el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre los linajes dentro de la Trucha Común, posiblemente enmascarados debido al origen polifilético de los haplotipos mitocondriales (Pustovrh *et al.* 2014), por lo que sus relaciones deberían ser revisadas.

V.4.3. La Trucha Común en el área mediterránea

El establecimiento del origen y el tiempo de diversificación de Trucha Común es primordial para entender los eventos evolutivos que han modelado la actual distribución de la especie. Las estimas basadas en las secuencias de ADN (Bernatchez *et al.* 1992, Giuffra *et al.* 1994, Osinov y Bernatchez 1996) consideran que la máxima divergencia entre las truchas atlánticas y mediterráneas es del 2%, mientras que los resultados basados en RFLPs (Machordom *et al.* 2000) o en el análisis de secuencias de ADN y RFLPs (Apostolidis *et al.* 1997) indican un valor de divergencia apreciablemente mayor (3%). Las estimas de divergencia basadas en la secuenciación de la D-Loop completa concuerdan con las derivadas de secuencias parciales de la D-Loop y Cyt b (Giuffra *et al.* 1994). Una calibración indirecta obtenida a partir de los registros fósiles condujo a una tasa de mutación media estimada de 1% por millón de años en los salmónidos (Smith 1992). Posteriormente, usando el aislamiento físico producido por el istmo de Panamá, Donaldson y Wilson (1999) estimaron una tasa de divergencia global en peces de 1% por millón de años en la región ND 5/6 y de 3,6% por millón de años para la región control, sugiriendo una tasa de sustitución intermedia entre estos valores para la totalidad del genoma mitocondrial. Por otro lado, Osinov y Bernatchez 1996 dataron la separación de las grandes líneas evolutivas de la Trucha Común a principios del Pleistoceno, considerando una divergencia de 0,8% por millón de años, que se aumentó posteriormente al 1,4 y 2% por millón de años (Bernatchez 2001). Finalmente, los últimos trabajos realizados en salmónidos por Crête-Lafrenière *et al.* (2012) combinando varios marcadores moleculares y diferentes técnicas analíticas han reducido esta tasa de divergencia a nivel mitocondrial para toda la familia Salmonidae al 0,3% por millón de años.

Usando un criterio amplio de divergencia entre 0,3 y 2% por millón de años, el tiempo de diversificación de la Trucha Común se encontraría situado entre finales del Plioceno y mediados del Pleistoceno. El linaje Danubio se separaría de las líneas atlánticas hace unos 4,4-

0,6 millones de años, mientras que la divergencia con los linajes mediterráneos ocurrió hace entre 3,6 y 0,5 millones de años. Siguiendo este mismo criterio, los tiempos de divergencia entre las líneas mediterráneas estarían entre 2,7 y 0,4 millones de años, siendo similar a la estima de tiempo de divergencia obtenido para los linajes *Atlántico* y *Duero* (2,9-0,4 millones de años). Estos resultados están en consonancia con lo observado en estudios previos en la especie (Osinov y Bernatchez 1996, Bernatchez 2001, Suárez *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2004, 2009, Pustovrh *et al.* 2014), relacionando las grandes subdivisiones filogeográficas y el origen de los linajes evolutivos a los cambios climáticos del Cuaternario. No obstante, estos valores se han inferido a partir de tasas de sustitución globales obtenidas de uno o varios genes, generalmente mitocondriales, relojes moleculares estrictos, registros fósiles de otras especies alejadas filogenéticamente y/o eventos geográficos distantes tanto temporal como geográficamente.

Las estimas obtenidas a partir de tasas de sustitución globales puede generar errores en los tiempos de divergencia inferidos y sus resultados deberían tomarse con precaución. Diferentes genes, regiones en una secuencia y posiciones en un mismo codón no siempre presentan las mismas presiones selectivas, pudiendo generar patrones de evolución muy diferentes (Bofkin y Goldman 2007), por lo que resulta apropiado asignar un modelo evolutivo para cada conjunto de datos (Sullivan y Joyce 2005, Shapiro *et al.* 2006). De la misma manera, las tasas no solo pueden variar sustancialmente entre genes y regiones, sino también entre linajes y grupos de organismos (Britten 1986, Hasegawa y Kishino 1989, Hasegawa *et al.* 2003). De hecho, en las últimas dos décadas los métodos de inferencia filogenética han sufrido un importante desarrollo, intentando integrar esta heterogeneidad de tasas (Sanderson 1997, Rambaut y Bromham 1998, Drummond *et al.* 2006, Rutschmann 2006, Rannala y Yang 2007, Dos Reis y Yang 2011). Sin embargo, para poder realizar estas estimas, los relojes moleculares deben ser calibrados empleando tanto el registro fósil como eventos biogeográficos, que han de ser incluidos preferiblemente como una escala de tiempo y no como un punto fijo en un árbol (Drummond *et al.* 2006, Ho y Phillips 2009). Los resultados de esta Tesis son los primeros centrados específicamente en el complejo de formas y variedades de la Trucha Común que integran todos estos criterios, incluyendo tres puntos de calibrado externos (dos fósiles de una especie hermana y una datación secundaria entre los géneros *Oncorhynchus* y *Salmo*) y la calibración de un nodo interno, lo que ha permitido la estimación de tiempos de divergencia más precisos.

Se estima que la divergencia dentro de la Trucha Común, calculada a partir del estudio de la D-Loop, tuvo lugar hace aproximadamente 0,7-2 millones de años (Osinov y Bernatchez 1996), situando la diversificación de los linajes matriarcales en el Pleistoceno (Bernatchez 2001, Suárez *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2004). Un resultado similar ha sido descrito recientemente por Pustovrh *et al.* (2014) empleando 22 loci nucleares. Sin embargo, otros estudios han indicado tiempos de divergencia anteriores para la especie y estiman que tuvo lugar durante el Messiniense o principios del Plioceno (2,5-6 millones de años, Apostolidis *et al.* 1997; 0,4-6,3 millones de años, Machordom *et al.* 2000). Los resultados obtenidos en la presente Tesis desplazan el tiempo de separación de los linajes evolutivos de la Trucha Común a entre 21 y 11 millones de años, observándose una diversificación posterior de los linajes *Adriático* y *Mediterráneo* solapada en el tiempo, hace unos 11 millones de años (rango entre 16 y 6

millones de años). En consecuencia, las grandes subdivisiones filogeográficas y el origen de los linajes evolutivos parecen ligados a la evolución geomorfológica del mediterráneo durante el Mioceno, periodo en el cual se empieza a configurar la estructura geográfica de todo área circum-mediterránea.

El patrón filogenético obtenido es congruente con la distribución geográfica de los linajes definidos para la Trucha Común. Los estudios previos en la especie postularon que la separación filogeográfica más antigua consistió en una fragmentación alopatrica en tres cuencas europeas principales: atlántica (línea *Atlántica*), Ponto-Cáspica (línea *Danubio*) y mediterránea (líneas *Adriática*, *Marmoratus* y *Mediterránea*), seguida de una fragmentación posterior entre los linajes mediterráneos (Bernatchez 2001, Suárez *et al.* 2001). Desde comienzos del Oligoceno (34 millones de años) hasta finales del Mioceno Medio (11,6 millones de años), toda el área mediterránea presentaba una fase de inestabilidad geológica. En este periodo, el mar de Paratetis se aisló del mar de Tetis y se produjo la desconexión casi total del área mediterránea del océano Atlántico e Indo-Pacífico (Rögl 1999). Durante el Mioceno Medio, los canales que comunicaban estas masas de aguas se cerraron, existiendo únicamente algunas conexiones esporádicas durante periodos cortos de tiempo entre el Paratetis y la cuenca mediterránea (Perrin y Bosellini 2012), proporcionando un escenario apropiado para el origen alopatrico de los linajes mitocondriales atlánticos, mediterráneos y *Danubio*. Por otro lado, en este mismo periodo de tiempo los Apeninos, junto con Sicilia y Maghrebides, formarían un cinturón orogénico continuo que separaría el mediterráneo oriental del occidental hasta finales del Mioceno (Rosenbaum *et al.* 2002, Rosenbaum y Lister 2004a, 2004b). La zona interna de la Cordillera Bética-Rifeña junto con las microplacas de Córcega, Cerdeña, Calabria y Kabiliyas, se encontraban unidas a los Alpes orientales, comenzando su separación hace unos 30 millones de años hasta dirigirse a su ubicación actual a mediados del Mioceno (Rosenbaum *et al.* 2002, Schettino y Turco 2006). La presencia de estas barreras orogénicas principales aislarían las distintas áreas del mar Mediterráneo entre sí, permitiendo la diferenciación alopatrica de los linajes *Adriático*, *Mediterráneo* y *Marmoratus*.

La edad del ancestro común más reciente de los linajes *Adriático* y *Mediterráneo* se estimó en aproximadamente 11 millones de años, durante el Tortonense. El clima cálido y húmedo del Mioceno Medio durante el Óptimo Climático (entre 17 y 15 millones de años) fue inmediatamente seguido de un enfriamiento gradual hace entre 15 y 12,5 millones de años, más acusado en latitudes medias y altas, caracterizado por una mayor diferenciación climática entre regiones, una circulación superficial del océano más dinámica que en etapas anteriores y la formación del casquete polar de la Antártida (Flower y Kennet 1994, Zachos *et al.* 2001, Abels *et al.* 2005). Esto tuvo grandes efectos en los ambientes acuáticos, generando un descenso de la temperatura y una fluctuación de la línea de costa generada por la variación del nivel del mar (Flower y Kennet 1994). Por lo tanto, sus efectos sobre estos linajes no deberían ser excluidos.

Según Bernatchez (2001), la línea *Mediterránea* se originó en la zona occidental del Mediterráneo en tiempos evolutivos similares a los de la formación de las líneas *Marmoratus* y *Adriática* en la zona italiana del Adriático y en los Balcanes, respectivamente. Posteriormente, Cortey *et al.* 2004, empleando la región completa de la región D-Loop e

incluyendo las secuencias procedentes de la Península Ibérica, modificaron y acotaron las áreas ancestrales de los linajes matriarcales *Adriático* y *Mediterráneo* a la cuenca del Po y a la zona de Rousillon en el sur de Francia, respectivamente. Los resultados obtenidos en la presente Tesis han desplazado el origen de la línea *Adriática* al mediterráneo occidental, compartiendo el área ancestral con el linaje *Mediterráneo*, y apoyando la monofilia de ambos linajes descrito por Pustovrh *et al.* (2014). El origen común de ambas líneas evolutivas se encontraría en las regiones actuales de la Península Ibérica austral y oriental, sur de Francia, Península Itálica e islas. La separación basal dentro de cada linaje de los haplotipos encontrados en Córcega **AD_{ADcs23}**, **AD_{ADcs24}**, **AD_{ADcs25}**, **ME_{MEcs22}** y **ME_{MEcs23}** parece apoyar dicha hipótesis. Por lo tanto, la divergencia entre ambas líneas estaría asociada a la separación del Sistema Bético-Rifeño y las microplacas de Córcega, Cerdeña Calabria y Kabilias del sur de Francia. Sin embargo, los numerosos contactos secundarios entre estos linajes (entre otros: Giuffra *et al.* 1996, Apostolidis *et al.* 1997, Berrebi *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001, Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004, Lecerteau-Köhler *et al.* 2013, Vera *et al.* 2013, Schenekar *et al.* 2014) podrían enmascarar su origen alopátrico, por lo que no deberían descartarse otros procesos evolutivos (Giuffra *et al.* 1994, Apostolidis *et al.* 1997, Suárez *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2004).

A finales del Mioceno, los eventos tectónicos a gran escala modificaron nuevamente la configuración paleogeográfica de la región circum-mediterránea. Por un lado, el mar Tirreno empezó a abrirse, conectando el Mediterráneo oriental y occidental hace entre 9 y 5 millones de años (Rosenbaum *et al.* 2002, Rosenbaum y Lister 2004a, 2004b). Por otro lado, tuvo lugar la elevación tectónica del Arco de Gibraltar que, junto con el descenso del nivel del mar, provocó la desconexión entre el mar Mediterráneo y el océano Atlántico (Krijgsman *et al.* 1999, Miller *et al.* 2005, Blondel y Aronson 2010). Durante la fase “*Lago Mare*” del Messiniense (Hsü *et al.* 1978) los cursos fluviales se conectaron al alejarse sus desembocaduras, facilitando la dispersión y colonización de la ictiofauna continental (Doadrio y Carmona 2003). Cortey *et al.* 2004 consideran que las condiciones climáticas en este periodo probablemente impidieron la expansión de la especie por toda el área mediterránea. Sin embargo, la Trucha Común presenta una gran plasticidad para adaptarse a un amplio rango de condiciones ambientales (Jonsson y Jonsson 2011) por lo que son presumibles unas características similares en el pasado. Por ejemplo, Meier *et al.* 2014 han observado en truchas anádromas, con respecto a las formas residentes, una mayor capacidad para adaptarse a variaciones de temperatura, posiblemente relacionada con el grado de heterogeneidad ambiental al que potencialmente estarían expuestas durante su ciclo de vida. Por lo tanto, un aumento de la temperatura podría provocar una selección negativa en contra de las truchas residentes o adaptadas localmente y a favor de las migradoras, potenciando su expansión y la colonización de nuevos cursos fluviales (Meier *et al.* 2014).

La temperatura del agua es un factor limitante en la distribución geográfica de la Trucha Común (Almodóvar *et al.* 2012), afectando a su supervivencia en todas las fases del desarrollo (Jonsson y Jonsson 2011). Por ejemplo, los embriones tienen una supervivencia máxima entre 8 y 10°C, y la temperatura crítica se sitúa en 14°C (Ojanguren *et al.* 2001). En fases más tardías los individuos son menos susceptibles a la temperatura (Elliott 1994) de tal forma que para los alevines el límite superior es de 22°C y para juveniles 25°C (Elliott y Elliott 2010). A finales de

Mioceno y principios del Plioceno el clima de toda la región mediterránea era templado, variando el régimen de precipitaciones dependiendo del área (Griffin 2002, Fauquette *et al.* 2006). En el mediterráneo occidental, la temperatura media anual osciló entre 16 y 25 °C, con un rango de entre 5 y 16 °C en el mes más frío y 20 y 28 °C en el más caluroso (Fauquette *et al.* 2006). Estas altas temperaturas parecen haber influido en la dispersión y aislamiento alopatrico de los linajes *Adriático* y *Mediterráneo*. El linaje *Adriático* comenzó su expansión hacia el este y sur durante el Tortonense (rango entre 8 y 6 millones de años), abarcando una mayor distribución geográfica que la línea *Mediterránea*, relegada al triángulo Península Ibérica oriental, sur de Francia, Córcega y Cerdeña. Durante el Messiniense y principios del Plioceno, la temperatura global aumentó en toda el área Mediterránea. En el mediterráneo occidental las temperaturas de las localidades situadas más al sur eran ligeramente superiores a aquellas más norteñas, presentando un régimen de precipitaciones significativamente inferior (Fauquette *et al.* 2006). Durante este periodo, el linaje *Adriático* se habría refugiado en las cabeceras de los ríos, extinguiéndose en aquellas localidades de menor altitud debido al aumento de temperatura global. Esto habría provocado un aislamiento entre cursos adyacentes, similar al observado actualmente en los ríos mediterráneos (Sanz *et al.* 2002, Snoj *et al.* 2009, Keller *et al.* 2011, Lerceteau-Köhler *et al.* 2013, la presente Tesis), que explicaría el pico de dispersión detectado durante el Messiniense (Figura V.9). Por otro lado, esta variación de temperatura parece no haber influido sobre el linaje *Mediterráneo*. Este linaje presentó una distribución restringida dentro del mediterráneo oriental, con características climáticas presumiblemente similares, adaptándose progresivamente a este aumento de temperatura o desplazándose progresivamente a áreas próximas más frías.

Los resultados obtenidos muestran una diversificación de los linajes *Adriático* y *Mediterráneo* no solo a finales del Mioceno, sino durante el Plioceno y los ciclos glaciales del Pleistoceno. Las glaciaciones del Cuaternario han influido notablemente en la diversificación de la Trucha Común, añadiendo mayor complejidad a su historia evolutiva. La edad de la mayor parte de los nodos terminales se encontró entre el Pleistoceno temprano y medio (linaje *Adriático*: rango entre 3 y 0 millones de años; linaje *Mediterráneo*: rango entre 2 y 0 millones de años), coincidiendo con la mayor extensión de las glaciaciones en todo el hemisferio norte (0,5-1,2 millones de años, Head y Gibbard 2005). Durante este periodo, la regresión del nivel del mar junto con la modificación de sus cursos fluviales habría permitido conectar poblaciones próximas anteriormente aisladas. Los grandes ríos tienden a poseer una estructura anastomosada, con redes de pequeños canales separados generados por el aumento de sedimentos y la disminución de su caudal. Las cumbres de los sistemas montañosos mediterráneos estarían ocupados por los hielos, desplazando a la ictiofauna aguas abajo. Todo ello, sumado al descenso de las temperaturas, pudo promover la expansión y diversificación dentro de los linajes *Adriático* y *Mediterráneo*. En los periodos interglaciales, el deshielo de los tramos de mayor altitud y el aumento del caudal en los grandes ríos mediterráneos habría provocado un desplazamiento de las truchas hacia las cabeceras, aislándose las poblaciones anteriormente conectadas. Por otro lado, el aumento del nivel del mar podría haber aislado poblaciones conectadas, afectando en mayor medida a aquellos ríos cortos, rápidos y poco caudalosos cuyas zonas de nacimiento y desembocadura se encontraran próximas

geográficamente. El linaje *Mediterráneo* presentó el mayor número de eventos de vicarianza a principios y mediados del Pleistoceno, con eventos de dispersión a lo largo de todo el Pleistoceno. Por otro lado, los periodos glaciales del Pleistoceno medio y superior fueron menos severos en amplitud y duración, mostrando una mayor expansión y diversificación del linaje *Adriático*, con un máximo de eventos de dispersión y vicarianza en estos periodos. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que las glaciaciones del Cuaternario actuaron de manera distinta sobre ambos linajes, ya sea por diferentes presiones evolutivas, patrones ecológicos o modificaciones paleogeográficas a las que fueron sometidos.

V.4.4. La Trucha Común en el sur de la Península Ibérica

La alta diferenciación y estructuración observada en el sur de la Península Ibérica es el resultado de una compleja historia evolutiva, sumada a la acción de fuertes cuellos de botella y de la deriva genética. El alto nivel de estructuración genética detectado sugiere que cada cuenca está compuesta por más de un acervo genético, con un intercambio entre ellos muy reducido, observándose algunos ríos más próximos genéticamente a ríos geográficamente lejanos que a aquellos más cercanos geográficamente. Estos ríos o conjuntos de ríos habrían sido colonizados por diferentes poblaciones separadas temporalmente, con numerosos procesos de colonización por dispersión y capturas fluviales, sin que deba descartarse el fuerte efecto de la deriva genética sobre la estructuración genética detectada.

La estructuración encontrada parece estar relacionada principalmente con patrones de diferenciación entre ríos, presentando algunas diferencias entre los distintos marcadores debidas a sus propias características intrínsecas. El patrón encontrado a nivel mitocondrial es coherente con el descrito previamente en poblaciones mediterráneas de Trucha Común en la Península Ibérica (Cortey *et al.* 2004, Vera 2006, Vera *et al.* 2010b, Fernández-Cebrián 2011, Sanz *et al.* 2011, Capítulo IV de esta Tesis) y en poblaciones residentes europeas (Estoup *et al.* 1998, Carlsson *et al.* 1999, Carlsson y Nilsson 2000, Heggenes y Røed 2006, Martínez *et al.* 2007), explicando la elevada estructuración observada debida, principalmente, a las diferencias existentes entre ríos o grupos de ríos. De hecho, aunque los niveles de diferenciación dentro y entre ríos fueron similares ($\Phi_{ST} = 0,933$, $p < 0,001$ y $\Phi_{SC} = 0,906$, $p < 0,001$, respectivamente), solo el 7% de esta variación explicaría las diferencias observadas entre las localidades de estudio. A nivel nuclear, la diferenciación observada dentro ($\Phi_{ST} = 0,284$, $p < 0,001$) fue similar a la encontrada entre los ríos de estudio ($\Phi_{SC} = 0,252$, $p < 0,001$). Sin embargo, el 72% de esta divergencia se generó por la diferenciación existente entre localidades, disminuyendo al 32% al comparar los ríos suribéricos. Los loci microsatélites son menos sensibles a la deriva genética y cuellos de botella que los marcadores mitocondriales. Sin embargo, la elevada fragmentación y el aislamiento poblacional, unidos a pequeños tamaños poblacionales, podrían haber potenciado una rápida diferenciación entre poblaciones próximas en la Trucha Común, ya sea en parte por la deriva genética (Carlsson *et al.* 1999, Heggenes y Røed 2006) como por la selección natural (Hansen *et al.* 2002). La importancia relativa de ambas fuerzas evolutivas es crucial a la hora de planificar estrategias de gestión, ya que únicamente deberían ser conservadas aquellas poblaciones cuya variabilidad genética sea generada por la selección natural, que representan

adaptaciones locales dentro del rango de distribución de una especie (Moran 2002). La variabilidad genética dentro de las localidades suribéricas es muy baja (datos no incluidos), se encuentran aisladas y presentan bajos tamaños efectivos poblacionales y signos de cuellos de botella recientes (Capítulo IV), por lo que es probable que la alta diferenciación encontrada a nivel local haya sido generada por la acción de la deriva genética. Por lo tanto, restaurar la conectividad eliminando las barreras infranqueables o construyendo pasos para peces debería ser una estrategia prioritaria para la recuperación de las poblaciones de Trucha Común en el sur de la Península Ibérica. Sin embargo, las diferencias poblacionales que se observan entre algunos ríos pueden ser el resultado de adaptaciones locales a nivel regional, generadas por una disminución o interrupción del flujo génico (Adkison 1995, Hansen *et al.* 2002), por lo que la eliminación de estas barreras debería ser estudiada en cada caso aisladamente.

Las oscilaciones climáticas del Cuaternario han jugado un papel muy importante en la estructuración y diversificación de la ictiofauna europea (Bernatchez y Wilson 1998, Tsigenopoulos *et al.* 2002, Volckaert *et al.* 2002, Perea *et al.* 2010, Dubut *et al.* 2012) e ibérica (Suárez *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2004, 2009, Gante *et al.* 2009). La gran variabilidad genética mitocondrial encontrada en la Trucha Común en la Península Ibérica, contrasta con la baja variabilidad de las poblaciones noratlánticas europeas (Cortey *et al.* 2004, 2009, McKeown *et al.* 2010). De hecho, la influencia glaciaria parece haber estado restringida al norte del continente, afectando a la estructura poblacional dentro de las redes hidrográficas, incrementando la variabilidad y diferenciación genética dentro y entre refugios y favoreciendo la introgresión entre linajes (Hewitt 1996, 2004). Cuando la temperatura bajó durante el periodo glaciario, el número de poblaciones de trucha que habitaban el norte de Europa disminuyó hasta casi su extinción, sobreviviendo algunas de ellas en determinados refugios glaciares, lo que disminuyó drásticamente su variabilidad (Hamilton *et al.* 1989, García-Marín *et al.* 1999b). Se estima que la divergencia dentro del complejo de formas o variedades de la Trucha Común calculada a partir de la región control tuvo lugar durante las glaciaciones del Pleistoceno (Bernatchez 2001, Suárez *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2004, 2009). Sin embargo, las poblaciones analizadas no han estado tan afectadas por las glaciaciones como las del norte y las centroeuropeas, diversificándose tanto genética como morfológica y ecológicamente durante estos eventos, tal y como se ha descrito en otras especies dulceacuícolas en poblaciones próximas (Gante *et al.* 2009, Almada y Sousa-Santos 2010). La mayor parte de los trabajos previos realizados en la Península Ibérica postulan que la estructura poblacional de la Trucha Común es el reflejo de patrones de aislamiento y deriva ocurridos durante el Cuaternario (García-Marín *et al.* 1996, Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004, 2009, Vera 2006, Fernández-Cebrián 2011). Sin embargo, aunque el efecto de los periodos glaciales e interglaciales ha influido notablemente en la diversificación de la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica, los resultados obtenidos muestran un patrón de colonización y diversificación más antiguo, aumentando este periodo desde el Mioceno Medio hasta el Pleistoceno.

La Cordillera Bético-Rifeña experimentó una elevación general durante el Mioceno inferior y medio, elevando la línea de costa a unos 820-900 metros sobre el nivel del mar (de Galdeano y López-Garrido 2000, de Galdeano y Alfaro 2004). En el Tortoniense la evolución tectónica de la zona elevó todo el sistema montañoso, comunicando sus ríos con el

Mediterráneo a través de las cuencas Neógenas Béticas (de Galdeano y Vera 1991, de Galdeano y Alfaro 2004). Un nuevo levantamiento a finales del Tortoniense y principios del Messiniense provocó la retirada definitiva del mar en numerosas cuencas, perdiendo las cuencas de Guadix-Baza y Granada, entre otras, su carácter marino (Rodríguez-Fernández 1982). Por tanto, la cuenca de Granada, que formará parte de la cuenca del Genil, habría quedado aislada del litoral mediterráneo, acumulando depósitos fluviales en las cuencas intramontañosas durante toda la crisis salina del Messiniense. De hecho, es en este periodo cuando se observa la separación de los haplotipos *Adriáticos* en el Mediterráneo occidental por eventos de vicarianza y dispersión (Figura V.7, nodos 94, 98,99 y 101), ocupando las secuencias ancestrales de los haplotipos **AD_{SI}4** y **AD_{SI}5** la futura cuenca del Genil hace entre 3 y 5 millones de años.

Por otro lado, las cuencas del Guadiana Menor y Alto Guadalquivir parecen haber sufrido colonizaciones más recientes durante el Pleistoceno Medio, reflejando en sus ríos una dotación haplotípica mitocondrial homogénea y una menor diferenciación y variabilidad poblacional a nivel nuclear. De hecho, la ausencia de la especie durante el Mioceno en el registro fósil de la cuenca de Guadix-Baza parece apoyar esta hipótesis (Doadrio y Casado, 1989). La baja diferenciación entre las cuencas parece indicar una única población colonizadora, de tal forma que la estructuración nuclear encontrada en algunos ríos del Guadiana Menor se explicaría por la presencia de cuellos de botella recientes (Capítulo IV) y la acción de la deriva genética. En cuanto a los orígenes de esta población ancestral, los resultados obtenidos parecen indicar una colonización de las cuencas del Alto Guadalquivir y Guadiana Menor desde la cuenca del Genil o desde algún punto próximo a ella. Esto se deduce a partir de los haplotipos mitocondriales ancestrales **AD_{SI}1** y **AD_{SI}1**, y de las poblaciones parentales 1 y 2 definidas por el programa *STRUCTURE*. A finales del Mioceno, en el litoral atlántico el Guadalquivir habría comenzado un proceso de erosión remontante hacia su cabecera, capturando a finales del Pleistoceno Medio las aguas del Guadix-Baza y Granada debido a un nuevo levantamiento y basculamiento de todo el sur de la Península Ibérica (Ruiz-Bustos *et al.* 1990, Ortiz *et al.* 2000, Ruano *et al.* 2000, Rodríguez-Vidal y Gracia-Prieto 2004). Sin embargo, la Trucha Común presenta una elevada variabilidad y plasticidad, por lo que no deberían descartarse otros escenarios. Por ejemplo, a finales del Mioceno y principios del Plioceno la temperatura en toda esta área era elevada (Fauquette *et al.* 2006), por lo que una colonización de la Península Ibérica oriental-austral vía marina sería factible al disminuir la temperatura global en el Cuaternario (Figura V.13).

La cuenca del Guadalfeo presentó los niveles de diferenciación poblacional más acusados, con cinco haplotipos mitocondriales de dos linajes evolutivos distintos y cuatro poblaciones parentales definidas por el programa *STRUCTURE*. La alta diversidad genética encontrada a todos los niveles pone de manifiesto varios eventos de colonización, sin que deba descartarse el fuerte efecto de la deriva genética sobre la estructuración genética detectada. El origen de esta cuenca se puede remontar al mismo periodo que la cuenca del Genil, cuando estaban emergidos los complejos Nevado-Filábride y Alpujárride casi en su totalidad (Vera 2000) y sus ríos formaban cuencas aisladas comunicadas con el mar (de Galdeano y López-Garrido 2000, de Galdeano y Alfaro 2004). La formación del Guadalfeo continuó a lo largo de todo el Mioceno hasta la actualidad, produciéndose un fuerte encajamiento de la red fluvial

generado por los movimientos tectónicos y la formación de fallas por toda la zona (de Galdeano y López-Garrido 2000, de Galdeano y Alfaro 2004, Martínez-Martínez *et al.* 2006, Pérez-Peña *et al.* 2010). Durante el Plioceno, la Península Ibérica austral habría sido ocupada por el linaje *Mediterráneo* (4 millones de años, rango entre 10 y 2 millones de años), separándose por un evento de vicarianza del sur de Francia (Figura V.8, nodo 62), ocupando la cuenca del Guadalfeo hace 1 millón de años (rango entre 0 y 8 millones de años) por un evento de dispersión (Figura V.8, nodo 44). Un evento posterior de vicarianza habría aislado la región austral del sur de la Península Ibérica (Figura V.8, nodo 37) durante el Pleistoceno (1,5 millones de años, rango entre 0 y 8 millones de años), quedando actualmente indicios de la colonización del linaje *Mediterráneo* en los ríos Lanjarón y Chico de Bérchules. Además, los movimientos tectónicos habrían favorecido la captura de las aguas del Dílar por el Padul por erosión fluvial en el área del Suspiro del Moro (Villegas Molina 1971, Ontiveros y Ramírez 2000). De hecho, los resultados a nivel mitocondrial y nuclear apoyarían esta hipótesis, observándose aún en la actualidad rastros de esta captura en los ríos Torrente, Poqueira, Trevélez y Grande de Bérchules. En el río Dílar no se detectó el haplotipo para la región control mitocondrial **AD_{SI}4**, mientras que si se encontró la secuencia **AD_{SI}2** para el gen Cyt b, ambas comunes entre las cuencas del Genil y Guadalfeo. Sin embargo, los bajos niveles de diversidad genética detectados en este curso (Capítulo IV) podrían explicar la pérdida de dicho haplotipo por la acción de la deriva genética. A pesar de desconocer la edad absoluta de formación de la cuenca del Guadalfeo, los ríos Poqueira y Trevélez mostraron indicios de una mayor antigüedad que aquellos cursos más occidentales (Pérez-Peña *et al.* 2010). Por lo tanto, no debería descartarse una captura fluvial por erosión remontante de las aguas del Genil y Maitena por los ríos Poqueira y Trevélez, presumiblemente anterior al levantamiento de todo el sistema Bético generado a partir del Plioceno. Los resultados obtenidos en cuanto a estructuración genética soportarían dicha hipótesis. Sin embargo, esta captura fluvial habría de ser muy antigua, debiendo observarse un patrón de diversidad genética muy superior al detectado (Capítulo IV). Durante los episodios glaciares, las cumbres de Sierra Nevada quedaron cubiertas por los hielos (Gómez-Ortiz *et al.* 1992), desplazando aguas abajo a las poblaciones fluviales y favoreciendo el flujo génico entre los ríos próximos. Tras la retirada de los hielos, las cabeceras serían colonizadas de nuevo, diferenciándose estas poblaciones en pocas generaciones (Ayllón *et al.* 2006). Durante los periodos glaciares, aquellos ríos que no estuvieran afectados por la acción de los hielos aumentarían su variabilidad genética, tal y como se ha observado en poblaciones del Pirineo catalán (Fernández-Cebrián 2011). En este periodo, prácticamente todas las cabeceras del Guadalfeo estaban completamente cubiertas por los hielos (Gómez-Ortiz *et al.* 1992, Mapa del Cuaternario de España 1:1.0.0, IGME 1989), con la excepción del río Grande de Bérchules. De esta forma se explicaría la alta diversidad nuclear encontrada en este río comparada con cursos próximos geográficamente. Sin embargo, los altos valores de diversidad observados en los ríos Chico de Sopontújar, Lanjarón y Torrente hacen pensar que la compleja historia paleogeográfica y evolutiva de la zona podría haber influido en mayor medida sobre el aumento de la variabilidad genética, pudiendo enmascarar o diluir el rastro dejado por las variaciones climáticas del Cuaternario sobre la diversidad genética de estas poblaciones.

La evolución de la cuenca del Segura en la zona de estudio está relacionada principalmente con los procesos tectónicos ocurridos a partir del Neógeno en la Cordillera Bética (de Galdeano y Vera 1991, Vera 1994). Los ríos analizados se sitúan en el subdominio paleogeográfico del Prebético Interno, y estuvieron hasta el Aquitaniense bajo la superficie marina (Vera 2000). La convergencia entre las placas del Alborán, Euroasiática y Africana a principios del Mioceno provocó una elevación de todo el sistema, individualizándose el estrecho Nordbético y aflorando los sedimentos de manera irregular, de tal forma que la cordillera se estructuró como cadena montañosa a mediados del Mioceno. Durante este periodo, el relieve emergido estaba formado por islas separadas, conectadas por cuencas y estrechos marinos. Los movimientos tectónicos sufridos a finales del Mioceno continentalizaron estas cuencas marinas formando pequeñas cuencas Neógenas Béticas donde se depositaron sedimentos lacustres en gran parte del Tortoniense superior y Messiniense (Elizaga y Calvo 1988, de Galdeano y Alfaro 2004). La formación de la cuenca del Segura continuó a lo largo de finales del Mioceno hasta la actualidad, produciéndose reajustes tectónicos junto con una elevación del terreno y vaciamiento de las cuencas Neógenas (Elizaga y Calvo 1988, de Galdeano y Vera 1991, de Galdeano y Alfaro 2004). La cuenca del Segura parece haber sido colonizada por varias poblaciones de los linajes *Adriático* y *Mediterráneo* durante el Pleistoceno. El origen polifilético de esta cuenca parece estar relacionado no solo con la Península Ibérica oriental, sur de Francia e Italia, sino con la propia cuenca del Guadalquivir. Los resultados obtenidos muestran un patrón de estructuración con varias poblaciones y no solo una panmíctica. De hecho, la estructuración y variación genética observadas ponen de manifiesto una posible colonización por captura fluvial del Alto Guadalquivir por parte del Segura, seguida de un posterior asilamiento y deriva. La presencia de los haplotipos **AD_{SI}1** y **AD_{Stc}1** junto con los resultados obtenidos a nivel nuclear parecen apoyar dicha hipótesis, soportando el patrón observado entre ambas cuencas previamente en ciprinidos. Los resultados obtenidos por Sanjur *et al.* (2003) mostraron un estrecho origen parafilético entre las poblaciones de cacho (*Squalius pyrenaicus*, Günther 1868) del Guadalquivir y del Segura, apoyando un posible escenario de contacto secundario y mezcla poblacional. Posteriormente, Gante *et al.* (2009) observaron un patrón similar en el barbo gitano (*Luciobarbus sclateri*, Günther 1868), explicando el origen polifilético encontrado en el Segura como resultado de la introgresión del Guadalquivir a finales del Pleistoceno. Sin embargo, debido a la proximidad genética observada con las cuencas del Adra y Andarax en algunos análisis (Figuras V.7 y V.14) no debería descartarse una colonización vía mar o por contacto secundario entre ríos próximos al descender el nivel de la costa durante el Pleistoceno. El linaje *Adriático* habría ocupado la cuenca a partir de un único evento de colonización, mientras que el linaje *Mediterráneo* mostró un patrón de colonización similar al observado en la cuenca del Guadalfeo (Figura V.14), ocupando la cuenca del Segura a finales del Pleistoceno (Figura V.7, nodos 34 y 43).

La Trucha Común ha sufrido numerosos procesos de radiación evolutiva en tiempos relativamente recientes, desde mediados a finales del Pleistoceno (entre otros: Bernáthcz 2001, Suárez *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2004, 2009, Pustovrh *et al.* 2014, esta Tesis). Este hecho, sumado a la alta introgresión genética alóctona y a la hibridación entre distintos linajes evolutivos nativos en algunos ríos, ha provocado que sea difícil distinguir aquellos procesos de

colonización o diferenciación más recientes. Aún así, los resultados obtenidos muestran una compleja historia para la Trucha Común relacionada con los principales eventos paleogeográficos del área mediterránea, no solo durante el Pleistoceno sino también en periodos anteriores, destacando la presencia de haplotipos ancestrales en el sur de la Península Ibérica. Los patrones de distribución geográfica obtenidos no solo han aportado nueva luz sobre la historia y las relaciones evolutivas de la Trucha Común, sino que pueden extrapolarse para inferir los posibles eventos que puedan haber generado la especiación y dispersión de otras especies dulceacuícolas en esta área.

VI. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

VI.1. DISCUSIÓN GENERAL

La Trucha Común presenta una elevada variabilidad no solo genética, sino también morfológica, fisiológica y ecológica. Sin embargo, la sobrepesca, las introducciones de truchas alóctonas y de especies exóticas, junto con la degradación y fragmentación del hábitat están amenazando seriamente a la especie, en especial a aquellas poblaciones con distribuciones más periféricas. A lo largo de la presente Tesis se han abordado numerosos aspectos relacionados con la diversidad y estructuración genética de la Trucha Común, centrándose especialmente en las poblaciones suribéricas donde la erosión de los recursos biológicos por actividades de influencia antropogénica afectan severamente, ya sea directa o indirectamente, a las poblaciones naturales. La combinación de varios marcadores moleculares ha proporcionado una idea más completa del estado genético de estas poblaciones, así como aquellos procesos involucrados en la creación y el mantenimiento de su diversidad genética.

El uso combinado de marcadores moleculares en la Trucha Común es de gran utilidad en los estudios de gestión poblacional y evaluación de las repoblaciones, ya que permiten identificar a sus progenitores en un stock de repoblación de origen nativo (Capítulo III), asignar individuos a poblaciones de la misma cuenca o río (Capítulo IV), detectar poblaciones de especial relevancia para la conservación debido a su variabilidad genética (Capítulo IV) e incluso trazar su historia demográfica y evolutiva (Capítulos IV y V). La posición de la Península Ibérica es crucial para la conservación de la diversidad genética de la especie (Almodóvar *et al.* 2006). Sin embargo, la singularidad genética de sus poblaciones está actualmente amenazada debido a la introgresión de genes alóctonos, causada por la repoblación de los ríos con truchas de origen centro y noreuropeo (Elvira 1995, Machordom *et al.* 1999, Elvira y Almodóvar 2001, Almodóvar *et al.* 2001, 2002, 2006). La introducción de material foráneo puede erosionar la estructura y diversidad genética de la especie e incluso provocar una pérdida de combinaciones genéticas únicas (entre otros: García-Marín *et al.* 1999a, Machordom *et al.* 1999, Almodóvar *et al.* 2001, 2006). Una vez que la hibridación ha comenzado, sino existe una selección en contra del material genético no nativo, el cruzamiento al azar generará en pocas generaciones un enjambre híbrido, aumentando progresivamente los individuos introgresados a la vez que los ejemplares parentales disminuyen progresivamente, eliminándose finalmente de la población (Allendorf *et al.* 2001). La selección en contra de los genes foráneos detectado en otras cuencas (entre otros: Hansen *et al.* 1995, 2002, 2010, Largiadèr y Scholl 1996, Poteaux *et al.* 1998) podría diluir el efecto negativo de la introgresión genética conduciendo, al menos en parte, a una recuperación natural de las poblaciones. De hecho, en el sur de la Península Ibérica las sueltas de truchas alóctonas cesaron a finales de los noventa, por lo que sería esperado observar una disminución del material genético no nativo en los ríos. Sin embargo, los genes foráneos son capaces de persistir en el tiempo aunque cesen las repoblaciones (Poteaux *et al.* 1998, Almodóvar *et al.* 2001, 2006, Araguas *et al.* 2008), observándose una baja o nula eliminación del material alóctono en las poblaciones de estudio (Capítulo III). Por lo tanto, quizás sea necesario más tiempo para que el efecto de estas introducciones se diluya o elimine (Poteaux *et al.* 1998, Almodóvar *et al.* 2001, 2006).

Los altos valores de introgresión encontrados en gran parte de las localidades y su persistencia en el tiempo indicaron la existencia de una elevada viabilidad de las truchas repobladas y sus descendientes (Capítulo III). Por otra parte, la inexistencia de diferencias significativas con el equilibrio de Hardy-Weinberg en casi la totalidad de las localidades que presentaron introgresión sugiere que los genes de las truchas de origen alóctono se incorporan a las poblaciones nativas mediante cruzamientos aleatorios con las truchas autóctonas (Capítulo III). La presencia de ejemplares híbridos dificulta la conservación y recuperación de las especies (Allendorf *et al.* 2001). Este hecho es más grave en las poblaciones analizadas, donde los genes alóctonos se encuentran totalmente integrados en las poblaciones, mostrando un acervo genético híbrido entre trucha autóctona y alóctona (Capítulo III y IV). El elevado número de ejemplares repoblados en el siglo pasado, sumado a los bajos tamaños poblacionales encontrados (Capítulo IV), parecen haber desplazando las variantes autóctonas en algunos ríos suribéricos, donde la presencia de alelos nativos es prácticamente inexistente con los marcadores empleados (Capítulo III). La competencia por el territorio y el alimento con la Trucha Arcoiris (Elvira 1996, Ribeiro y Leunda 2012), podría potenciar la adaptación de los ejemplares alóctonos y sus híbridos debido al desplazamiento de la especie nativa hacia hábitat con mayor velocidad de corriente y menor profundidad (Blanchet *et al.* 2007), más favorables para las truchas de origen centro y noreuropeo. Además, la Trucha Común es una de las especies dulceacuícolas más invasivas a nivel mundial. Su elevada variabilidad morfológica, fisiológica y ecológica (Jonsson y Jonsson 2011), asociada fundamentalmente con su alta plasticidad para adoptar diferentes patrones de crecimiento y reproductivos (Almodóvar 1999, Nicola y Almodóvar 2002, 2004, Parra *et al.* 2009, 2014) le han permitido establecerse en ecosistemas dulceacuícolas a lo largo de todo el globo. Por lo tanto, a pesar de que en el sur de la Península Ibérica las condiciones ambientales son muy restrictivas para los requerimientos de la especie, no debería descartarse la adaptación local de los ejemplares híbridos.

La introducción de especies exóticas es una de las principales causas de regresión de la ictiofauna autóctona en la Península Ibérica (Elvira 1996, Elvira y Almodóvar 2001, Doadrio *et al.* 2011). De hecho, la introducción de ejemplares de origen alóctono, entre los que se encuentran las repoblaciones con Trucha Común de origen exótico, están prohibidos actualmente en todo el territorio nacional (Artículo 52.2 de la Ley 42/2007 de Patrimonio Natural y Biodiversidad), siendo catalogadas y listadas en 2011 34 especies de peces dulceacuícolas exóticas invasoras (Real Decreto 1628/2011). Sin embargo, las presiones de las Comunidades Autónomas, los colectivos de pesca continental y asociaciones de pescadores han llevado a una nueva modificación en 2013 (Real Decreto 630/2013), excluyendo de este catálogo a especies como el Black Bass, la Carpa y la Trucha Arcoiris, incluidos dentro de las 100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo por la IUCN (Lowe *et al.* 2000). Por lo tanto, aún en día se están introduciendo regular y sistemáticamente ejemplares de especies exóticas en numerosos tramos de pesca intensiva y cotos, todo ello amparado por las Comunidades Autónomas competentes. Por ejemplo, desde 2009 la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de Andalucía está llevando a cabo trabajos para el control de las poblaciones naturalizadas de Trucha Arcoiris en aquellos tramos con presencia actual o potencial de la Trucha Común. Por lo tanto, parece contradictoria la gestión de los recursos

dulceacuícolas en esta Comunidad Autónoma, ya que por un lado está llevando a cabo trabajos de descaste de truchas alóctonas para disminuir la competencia por el territorio y los recursos tróficos con la Trucha Común, y por otro promueve la reintroducción de la Trucha Arcoiris en cotos para su aprovechamiento deportivo. En el caso de las repoblaciones de Trucha Común de origen alóctono es aún más llamativo en regiones como la Comunidad de Madrid, donde la Administración ha estado ignorando la legislación vigente, amparándose en que las repoblaciones con truchas foráneas son limitadas y en tramos donde no existen poblaciones nativas (BOAM 137/2013).

La sociedad, incluidos algunos colectivos de pescadores, han empezado a concienciarse de la importancia de conservar las poblaciones naturales desde una visión más global, en la que toman relevancia valores como el mantenimiento de la biodiversidad y el patrimonio genético. Así, la gestión no debería buscar únicamente mantener un número elevado de efectivos, sino que debe garantizar el futuro de las poblaciones y de su patrimonio genético. Por ejemplo, debido al mal estado de la fauna dulceacuícola en el sur de la Península Ibérica, en 2012 la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad Autónoma de Andalucía aprobó un plan de recuperación y conservación de peces e invertebrados de medios acuáticos epicontinentales (BOJA 60/2012). En relación a la especie de estudio, las repoblaciones de Trucha Común alóctona en cotos y tramos de pesca intensiva finalizaron a finales del siglo pasado en los ríos suribéricos. Además, desde 2005 la Comunidad Autónoma de Andalucía ha desarrollado un conjunto de actuaciones encaminadas a recuperar la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica, poniendo en marcha un Programa de Recuperación de la especie en esta región prohibiendo, entre otras acciones, su pesca extractiva en toda la región (BOJA 50/2005).

El efecto de la introducción de genes alóctonos ha afectado en gran medida a la estructura genética de la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica (Capítulos III y IV). Las truchas no pueden adaptarse a un determinado entorno si hay una adición continua de peces no adaptados. Por ello, la opción de repoblar con truchas autóctonas ayudaría a incrementar las densidades poblacionales, así como a disminuir los niveles de introgresión genética sin que suponga un riesgo el cruzamiento con ejemplares nativos (Ryman y Laikre 1991, Ferguson 2007, Caudron *et al.* 2011). Sin embargo, no se debe subestimar el riesgo de endogamia potencial y la pérdida de variación genética generadas por la introducción de grandes cantidades de ejemplares de piscifactoría (Ryman y Laikre 1991, Hansen *et al.* 2000b, Laikre *et al.* 2010). En la Península Ibérica la Trucha Común presenta una fuerte diferenciación genética a nivel poblacional (Machordom *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001, Presa *et al.* 2002, Sanz *et al.* 2002, 2011, Cortey *et al.* 2004, 2009, Vera *et al.* 2013, Capítulos III y IV). Por lo tanto, intentar mantener la elevada variabilidad de nuestros ríos en líneas de piscifactoría parece una tarea titánica e inviable técnica y económicamente. Cabe destacar, que el riesgo de realizar reintroducciones de ejemplares cuya dotación genética sea distinta a la población receptora es muy elevado, ya sea en variantes como en frecuencias alélicas. Por lo tanto, las sueltas no deberían ir encaminadas a aumentar el número de ejemplares disponibles sino a repoblar tramos aislados en los que la especie esté ausente o en inminente peligro de extinción, evitando el cruce entre poblaciones genéticamente diferenciadas.

Algunas Comunidades Autónomas están desarrollando “líneas puras o autóctonas” en piscifactorías, proponiéndose eliminar las líneas foráneas de uso frecuente hasta hace muy poco. Sin embargo, para el desarrollo de estas líneas es necesario tener un conocimiento previo de las unidades genéticas de las diferentes poblaciones, con el fin de preservar los acervos génicos propios de cada región, que son los mejor adaptados en cada río. Tradicionalmente, la identificación de los “stocks nativos” se ha llevado a cabo empleando el marcador nuclear *LDH-CI** y la amplificación de la región D-Loop mitocondrial. Tal y como se ha observado a lo largo de toda esta Tesis, estos marcadores solo muestran una pequeña parte de la variabilidad existente a nivel intra e interpoblacional (Capítulos IV y V). Además, la elevada diferenciación entre poblaciones dentro de las cuencas dificulta el desarrollo de líneas autóctonas, que se plantea mucho más complejo que el basado únicamente en el análisis del ADN mitocondrial. En relación a la utilización del locus *LDH-CI** para detectar ejemplares de origen foráneo, este marcador mostró una mayor eficiencia y una alta persistencia a corto plazo (Poteaux *et al.* 1998, García-Marín *et al.* 1999a, Almodóvar *et al.* 2001, 2006, Sanz *et al.* 2006, Araguas *et al.* 2008, Capítulo III). Sin embargo, en poblaciones donde ha existido un gran esfuerzo de repoblación, los alelos foráneos pueden estar totalmente integrados en el genoma. En estos casos, los análisis de loci microsatélite ayudarían a detectar alelos exóticos o genotipos híbridos que por su bajo grado de introgresión no son observados con otros marcadores moleculares (Capítulo III).

Un ejemplo de este tipo de gestión encaminada al desarrollo de líneas nativas se está llevando actualmente en la Comunidad Autónoma de Andalucía. Desde 2008 la Administración está criando en cautividad Trucha Común procedente del río Castril, llevando a cabo sueltas en la cuenca del Guadalquivir en tramos y ríos con presencia histórica de la especie y en los que actualmente se encuentra ausente. Los análisis realizados en este río empleando el locus diagnóstico *LDH-CI** no detectaron ningún alelo de origen alóctono. Sin embargo, los resultados de loci microsatélite han mostrado la presencia de alelos de origen foráneo (Capítulo III). Por lo tanto, las repoblaciones realizadas no se corresponden con poblaciones completamente autóctonas sino que presentan un bajo porcentaje de alelos de origen exótico. Además, el río Castril muestra una elevada diferenciación genética nuclear (Capítulos IV y V), posiblemente potenciada por la acción de la deriva genética (Capítulo IV). Los resultados obtenidos a nivel mitocondrial a partir de la región control mostraron una dotación haplotípica homogénea común con las cuencas del Alto Guadalquivir y Guadiana Menor (Capítulo IV). Sin embargo, aumentando el número de marcadores genéticos, los resultados obtenidos mostraron un nivel de estructuración más complejo, reflejo tanto de su historia evolutiva (Capítulo V) como demográfica más reciente (Capítulo IV). Por lo tanto, la población parental empleada no es representativa de la diversidad genética de toda la cuenca sino del propio río. Finalmente, en 2013 el Centro de conservación y cría de especies de agua dulce de la Conserjería de Medio Ambiente consiguió cerrar el ciclo de cultivo de la Trucha Común “autéctona”, obteniéndose truchas adultas reproductoras sin necesidad de realizar capturas en el medio natural. A parte de la potencial domesticación de estos ejemplares, el continuo cruce de individuos emparentados conlleva asociado un alto índice de endogamia, desembocando en una pérdida de diversidad genética junto con un desequilibrio de las frecuencias alélicas. Por lo tanto, los ejemplares de repoblación podrían haber perdido genes adaptativos, produciéndose un deterioro genético de

igual o mayor magnitud que el generado por la introducción de truchas de origen alóctono (Vidal y García-Marín 2011).

La pérdida del hábitat y la fragmentación poblacional están consideradas como una de las principales amenazas que afectan a la diversidad biológica. La presencia de barreras artificiales o naturales en los ríos provoca una reducción del tamaño poblacional y limita el intercambio de material genético, provocando la disminución de la diversidad genética a corto o largo plazo y cambios en la estructura poblacional (Carlsson *et al.* 1999, Meldgaard *et al.* 2003, Van Houdt *et al.* 2005, Heggenes y Røed 2006, Horreo *et al.* 2011). La alta estructuración genética encontrada para la Trucha Común (Bouza *et al.* 1999, Aurelle y Berrebi 2001, Sanz *et al.* 2002, Corujo *et al.* 2004, Ruzzante *et al.* 2004, Sønstebo *et al.* 2007, McKeown *et al.* 2010, Capítulo IV), junto con su elevada capacidad de adaptación local (Taylor 1991, Hansen *et al.* 2002, Hansen *et al.* 2007, Meier *et al.* 2011) hace posible que los ríos suribéricos presenten poblaciones estables y auto-sostenibles de truchas nativas adaptadas localmente. Por ejemplo, la especie de estudio presenta un único período de freza entre Noviembre y Enero, cuando la temperatura del agua oscila entre 5 y 10 °C (Doadrio 2011). Sin embargo, en el sur de la Península Ibérica el periodo de freza se extiende desde Diciembre hasta mediados de Abril (Gortázar *et al.* 2007), constituyendo una ventaja en un medio con un régimen hidrológico con variaciones interanuales impredecibles (Gortázar *et al.* 2007). Por lo tanto, no sería extraño encontrar otras adaptaciones locales particulares asociadas con su hábitat.

La alta diferenciación y estructuración observadas en el sur de la Península Ibérica es el resultado de una compleja historia evolutiva, sumada a la acción de fuertes cuellos de botella y de la deriva genética (Capítulos IV y V). El alto nivel de estructuración genética detectado sugiere que cada cuenca está compuesta por más de un acervo genético, con un intercambio entre ellos muy reducido, observándose algunos ríos más próximos genéticamente a ríos geográficamente más lejanos que a aquellos más cercanos geográficamente. Estos ríos o conjuntos de ríos habrían sido colonizados por diferentes poblaciones separadas en el tiempo, con numerosos procesos de colonización por dispersión y capturas fluviales (Capítulo V). Además, la elevada fragmentación del hábitat, tanto natural como antropogénica, parece haber influido notablemente en el patrón de estructuración encontrado. El sur de la Península Ibérica presenta un fuerte déficit hídrico estival con un régimen de precipitaciones muy irregular, con largos períodos de sequía seguido por períodos con lluvias, generalmente de carácter torrencial, presentando los ríos un caudal escaso e irregular. Durante los períodos de sequía, la falta de precipitaciones desconectaría temporalmente los cursos fluviales, provocando el aislamiento poblacional de la fauna dulceacuícola. El régimen de precipitaciones en el área de Sierra Nevada es muy inferior a la región de las Sierras de Aracena, Cazorla-Segura y Grazalema, por lo que sería de esperar una menor estructuración poblacional dentro de las cuencas del Alto Guadalquivir y Segura que en el resto de cuencas mas sureñas. Por lo tanto, esta estacionalidad en las precipitaciones podría explicar la elevada estructuración encontrada en la cuenca del Genil donde sus ríos, aún próximos geográficamente, forman unidades altamente diferenciadas (Capítulo IV). Los ríos pertenecientes a la cuenca del Guadalfeo parecen haber sufrido distintos eventos de colonización, dispersión y vicarianza (Capítulo V), por lo que la estructuración encontrada sería mantenida.

En la mayor parte de los ríos no se detectaron signos de cuellos de botella recientes (Capítulo IV). Sin embargo, esto no significa que no hayan sufrido reducciones poblacionales en el pasado. En términos generales, la baja diversidad genética, el número de alelos fijados y los procesos de expansiones poblacionales encontrados son el reflejo de reducciones poblacionales en el pasado (Capítulo IV). La presencia de cuellos de botella recientes y los altos niveles de estructuración encontrados a nivel de localidad, junto con los bajos tamaños efectivos poblacionales y la nula migración global observada sugiere la existencia de poblaciones claramente aisladas, generadas por la alta fragmentación artificial de la zona (Heggenes y Røed 2006, Hórreo *et al.* 2011). A pesar de que en el sur de la Península Ibérica los ríos presentan numerosas barreras naturales, estas no bloquean la dispersión de ejemplares en dirección aguas abajo. Al construir barreras artificiales infranqueables, este flujo se interrumpe, aumentando los niveles de diferenciación poblacional no solo entre ríos, sino entre tramos próximos. Debido a que la deriva genética actúa más rápido reduciendo la variabilidad genética en las poblaciones pequeñas, el experimentar un cuello de botella puede disminuir drásticamente la variabilidad de una población, incluso aunque el cuello de botella no se prolongue durante muchas generaciones. Una disminución de la variabilidad genética puede implicar que la población no tenga la capacidad de adaptarse a las nuevas presiones selectivas, debido a que la variabilidad genética sobre la que actuaría la selección habría desaparecido ya de la población. A pesar de que los salmónidos pueden responder a los cambios ambientales en pocas generaciones (Haugen y Vøllestad 2000, Hansen *et al.* 2002, Wofford *et al.* 2005, Fraser *et al.* 2011), la capacidad de adaptación a un medio depende del flujo y deriva genética, así como de la fuerza de la selección y el acervo génico poblacional (Adkison 1995, Hansen *et al.* 2002, 2007, Wofford *et al.* 2005, Hendry *et al.* 2007), por lo que su diversidad genética debe ser mantenida.

La estabilidad poblacional a largo plazo a menudo no es posible sin aplicar estrategias de mejora del hábitat (restauración de orillas, eliminación de saltos infranqueables, mejora del régimen hidrológico, entre otras.), que en general son más eficaces que la introducción de ejemplares (Cowx 1994, Fjellheim *et al.* 2003, Oosterhout *et al.* 2005, Ferguson 2007). Las poblaciones suribéricas de Trucha Común son muy antiguas (Capítulo V), presentan variantes haplotípicas y alélicas únicas (Capítulos IV y V) y patrones reproductivos adaptados a su hábitat (Gortázar *et al.* 2007). Por lo tanto, la implantación de medidas de protección y recuperación de estas poblaciones deberían ser prioritarias para la recuperación de la especie en el sur de la Península Ibérica, al fin de evitar un mayor deterioro de la integridad genética. Por lo tanto, en el presente escenario en el que la introgresión está repartida de manera heterogénea, la existencia de barreras infranqueables protegería a las poblaciones de ser colonizadas por ejemplares foráneos de localidades próximas evitando la pérdida de variación genética nativa por cruzamiento con ejemplares foráneos (Van Houdt *et al.* 2005, Caudron *et al.* 2011). Sin embargo, en la presente Tesis no se detectaron ni diferencias en el nivel de introgresión al comparar ríos y localidades (Capítulo III), ni estructuración genética a nivel de localidad (Capítulo IV) ya que, salvo contadas excepciones, únicamente se observaron diferencias genéticas entre cursos fluviales y cuencas (Capítulo IV y V). Por lo tanto, restaurar la conectividad dentro de los propios ríos eliminando las barreras infranqueables o construyendo pasos para peces debería ser una estrategia prioritaria para la recuperación de la especie.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis no solo han puesto de manifiesto la variabilidad, estructuración y estado genético de la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica (Capítulos III y IV), sino que ha permitido establecer el origen y el tiempo de diversificación del complejo tanto a nivel europeo como ibérico, primordial para entender los eventos evolutivos que han modelado su distribución actual. Sin embargo, los resultados no han permitido confirmar o desmentir el origen Asiático postulado por otros autores (Bernatchez *et al.* 1992, Suárez *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2004, Griffiths *et al.* 2009b) ni esclarecer las relaciones filogenéticas entre los cinco linajes evolutivos definidos para la Trucha Común, por lo que sus relaciones deberían ser nuevamente revisadas. El nivel de resolución obtenido a partir de los análisis filogenéticos ha reafirmado la monofilia de la especie de estudio, así como el origen común de cada una de sus líneas evolutivas. De esta manera, las grandes subdivisiones filogeográficas y el origen de los linajes evolutivos parece estar asociado con la evolución geomorfológica de todo el área circum-mediterránea durante el Mioceno (Capítulo V), en contraposición con las dataciones posteriores obtenidas a partir de tasas de sustitución globales (Osinov y Bernatchez 1996, Apostolidis *et al.* 1997, Machordom *et al.* 2000, Bernatchez 2001, Suárez *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2004, 2009, Pustovrh *et al.* 2014). La presencia de las barreras orogénicas presentes en este período crearían los escenarios apropiados tanto para la separación geográfica de las líneas *Atlántica*, *Danubio* y los linajes mediterráneos, como para la diferenciación alopátrica de las líneas *Adriática*, *Mediterránea* y *Marmoratus*.

Un análisis más detallado de los linajes *Adriático* y *Mediterráneo* ha permitido determinar tanto sus orígenes geográficos como las rutas de colonización posteriores que han definido su distribución actual en el área mediterránea (Capítulo V). Los resultados obtenidos han desplazado el centro de origen de la línea *Adriática* desde la zona adriática (Bernatchez 2001, Cortey *et al.* 2004) al mediterráneo occidental, compartiendo su área ancestral con el linaje *Mediterráneo*. El origen común de ambas líneas evolutivas se encontraría en la región formada por la Península Ibérica austral y oriental, sur de Francia, Península Itálica e islas. Por lo tanto, la divergencia entre ambos linajes estaría asociada a la separación del Sistema Bético-Rifeño y las microplacas de Córdega, Cerdeña Calabria y Kabalias del sur de Francia. Sin embargo, los numerosos contactos secundarios entre ellos (entre otros: Giuffra *et al.* 1996, Apostolidis *et al.* 1997, Berrebi *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001, Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004, Lerceteau-Köhler *et al.* 2013, Vera *et al.* 2013, Schenekar *et al.* 2014) podrían enmascarar su origen alopátrico, por lo que no deberían descartarse otros procesos evolutivos (Giuffra *et al.* 1994, Apostolidis *et al.* 1997, Suárez *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2004).

La crisis salina del Messiniense y las oscilaciones climáticas del Cuaternario han jugado un papel muy importante en la diferenciación y diversificación de las especies, siendo especialmente determinantes en la estructuración de la Trucha Común (entre otros: Hamilton *et al.* 1989, Osinov y Bernatchez 1996, García-Marín *et al.* 1999, Bernatchez 2001, Weiss *et al.* 2000, Machordom *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2004, 2009 McKeown *et al.* 2010). El linaje *Adriático* comenzó su dispersión hacia el este y sur durante el Tortonense, refugiándose a finales del Mioceno y principios del Plioceno en las cabeceras de los ríos, extinguiéndose en aquellas localidades de menor altitud debido al aumento de temperatura global. Durante este período, la línea *Mediterránea* presentó una distribución restringida dentro del mediterráneo

oriental al triángulo Península Ibérica oriental, sur de Francia, Córcega y Cerdeña, con características climáticas presumiblemente similares, adaptándose progresivamente a este aumento de temperatura o desplazándose progresivamente a áreas próximas de más frías. El descenso de las temperaturas en el Plioceno, y en especial durante el Cuaternario, han influido notablemente en la diversificación de la Trucha Común, añadiendo mayor complejidad a su historia evolutiva. De hecho, la edad de la mayor parte de los nodos terminales de ambos linajes se encontró entre el Pleistoceno temprano y medio, coincidiendo con la mayor extensión de las glaciaciones en todo el hemisferio norte (Head y Gibbard 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que los períodos glaciales del Cuaternario actuaron de manera distinta sobre ambos linajes, ya sea por diferentes presiones evolutivas, patrones ecológicos o modificaciones paleogeográficas a las que fueron sometidos (Capítulo V).

La mayor parte de los trabajos previos realizados en la Península Ibérica postulan que la estructura poblacional de la Trucha Común es el reflejo de patrones de aislamiento y deriva ocurridos durante las glaciaciones del Cuaternario (García-Marín *et al.* 1999, Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004, 2009, Vera 2006, Fernández-Cebrián 2011). Las cuencas suribéricas muestran un patrón de colonización y diversificación para la especie asociado al Pleistoceno, con varios eventos de dispersión y vicarianza relacionados con los cambios de temperatura global durante este período (Capítulo V). Las genealogías de ADN mitocondrial obtenidas muestran eventos de expansión poblacional a finales del Pleistoceno Medio en las cuencas del Guadalquivir y Guadalfeo (Capítulo IV), periodo en el cual se produce un levantamiento y basculamiento de las cuencas del Guadix-Baza y Granada (Ruiz-Bustos *et al.* 1990, Ortiz *et al.* 2000, Ruano *et al.* 2000) y con la progresiva retirada de los hielos debido al fin del período glacial de Würm. La mayor parte de las cuencas suribéricas habrían sido colonizadas durante este período por procesos de captura fluvial y/o dispersión a través del mar Mediterráneo (Capítulo V). Sin embargo, aunque el efecto de los periodos glaciales e interglaciales ha influido notablemente en su diversificación genética, los resultados obtenidos muestran un patrón de colonización y diversificación más antigua, estando presente el linaje *Adriático* en el sur de la Península Ibérica desde finales del Mioceno (Capítulo V). Los peces de agua dulce aportan de una manera más fiable señales sobre la historia y paleogeografía de los sistemas hidrológicos (Blondel *et al.* 2010), incluyendo los contactos y aislamientos entre cuencas, ríos y lagos. El potencial carácter anádromo de la Trucha Común no ha eliminado completamente esta información. Sin embargo, la elevada variabilidad encontrada, junto con los numerosos contactos secundarios y la hibridación genética actual, ha provocado que sea difícil distinguir aquellos procesos de colonización o diferenciación más recientes. Aún así, los resultados obtenidos apoyan el patrón observado previamente en ciprínidos, siendo la fase *Lago Mare* demasiado reciente para explicar la especiación y dispersión de los peces de agua dulce en la Península Ibérica (Doadrio y Carmona 2003, 2004, Robalo *et al.* 2007, Levy *et al.* 2009).

La ictiofauna continental es muy antigua, presentando algunas especies patrones de distribución que reflejan la configuración fluvial existente antes de este periodo (Doadrio y Carmona 2003, 2004, Sanjur *et al.* 2003, Cunha *et al.* 2004, Levy *et al.* 2009, Perea *et al.* 2010, Gante *et al.* 2010, Sousa-Santos *et al.* 2014). Los resultados obtenidos muestran una compleja historia para la Trucha Común relacionada con los principales eventos paleogeográficos del área

mediterránea, no solo durante el Pleistoceno sino también en periodos anteriores, destacando la presencia de haplotipos ancestrales en el sur de la Península Ibérica. Los resultados obtenidos no han sido confirmados a partir del registro fósil, ya que los ejemplares más antiguos encontrados en la Península Ibérica datan del Pleistoceno (Muñoz y Casadevall 1997, Consuegra *et al.* 2002, Perea y Doadrio 2009). De hecho, la ausencia de fósiles durante el Mioceno y Plioceno no rechaza la hipótesis expuesta ya que, exceptuando las cuencas del Genil y Guadalfeo, la dispersión del resto de cursos fluviales ibéricos aparece asociada al Cuaternario (Capítulo V). El descubrimiento de fósiles previos al Messiniense en el área de la cuenca de Granada podría ayudar en el análisis de los patrones de dispersión de la fauna dulceacuícola, permitiendo apoyar o rechazar las hipótesis expuestas en esta Tesis.

VI.2. CONCLUSIONES

A lo largo de esta Tesis se ha realizado una aproximación al conocimiento de la variabilidad y estructuración genética de la Trucha Común, así como los procesos implicados en la distribución actual de la especie. Los trabajos previos en el sur de la Península Ibérica pusieron de manifiesto la singularidad de sus poblaciones. Sin embargo, el bajo número de poblaciones analizadas no podía ser extrapolado a todo el área de distribución, siendo esta Tesis el primer trabajo que incluye los datos de todos los ríos trucheros en los que la especie está presente de manera natural en el sur de la Península Ibérica. De hecho, los resultados obtenidos pueden ser aplicados en futuros planes de ordenación de la pesca en esta área, siendo además, un excelente punto de partida para estudios evolutivos más profundos y ambiciosos.

Los resultados más relevantes obtenidos en esta Tesis pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

Capítulo III:

1. El 70% de las localidades y el 85% de los ríos presentaron introgresión de material genético procedente de truchas de repoblación. Se detectó un nivel medio de introgresión alto (20%), superior al promedio detectado en otras cuencas de la Península Ibérica, así como una elevada variabilidad en la presencia del alelo exógeno *LDH-CI*90* dependiendo del río o cuenca analizado.
2. Los altos valores de introgresión y la ausencia de diferencias significativas con el equilibrio de Hardy-Weinberg en gran parte de las poblaciones suribéricas indicaron la existencia de una elevada viabilidad de las truchas repobladas y sus descendientes, incorporándose los genes alóctonos a las poblaciones nativas mediante cruzamientos aleatorios.
3. La variabilidad observada en los valores de introgresión medios muestra que el efecto negativo de las repoblaciones es muy variado, y que depende de diversos factores genéticos y no genéticos específicos a nivel de localidad. Las diferencias de introgresión

genética encontradas entre ríos, cuencas y vertientes parece determinada por factores ambientales y poblacionales no analizados en esta área de estudio.

4. La evolución temporal de las tasas de introgresión genética mostró una baja o nula selección en contra de las truchas de origen alóctono y sus descendientes. Probablemente sea necesario un período de tiempo mayor para que estos alelos se pierdan en la población, aunque no debería descartarse la presencia de adaptación local a las condiciones ambientales en algunas de sus poblaciones.
5. Los marcadores empleados son igual de útiles para analizar la incidencia de la repoblación en poblaciones mediterráneas. Sin embargo, la utilización del locus *LDH-CI** mostró una mayor eficiencia y una alta persistencia a corto plazo mientras que los loci microsatélites permiten detectar introgresión por material foráneo a largo plazo, cuando el alelo exótico *LDH-CI*90* ha sido eliminado de la población. Por lo tanto, la utilización de uno u otro marcador dependerá de los registros de reintroducciones, de la fiabilidad de estos datos y del grado de detección de ejemplares híbridos y foráneos que se desea obtener.

Capítulos III y IV:

6. Las introducciones de material genético foráneo han modificado la diversidad y estructura genética de la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica, encontrándose los alelos alóctonos totalmente integrados en algunas de sus poblaciones.

Capítulo IV:

7. Las poblaciones de Trucha Común suribéricas presentan unos elevados niveles de diversidad genética mitocondrial y nuclear intrapoblacionales no observados en estudios anteriores. La variabilidad genética detectada no se distribuyó de manera homogénea, encontrando desde poblaciones completamente monomórficas a nivel mitocondrial o con numerosos alelos fijados empleando los loci microsatélites, hasta otras con valores muy elevados.
8. Las cuencas suribéricas revelaron un nivel de estructuración genética muy elevado no observado previamente en esta área, sugiriendo un flujo de genes restringido tanto a nivel intra como interpoblacional. La estructuración encontrada parece estar relacionada principalmente con patrones de diferenciación entre ríos y cuencas, detectándose a nivel mitocondrial y nuclear unos nulos o moderados niveles de diferenciación relacionados con patrones hidrológicos entre las localidades dentro de un mismo río.
9. La presencia de cuellos de botella recientes y los altos niveles de estructuración encontrados a nivel de localidad, junto con los bajos tamaños efectivos poblacionales y

la nula migración global observada sugiere la existencia de poblaciones claramente aisladas, generadas por la alta fragmentación artificial de la zona.

10. La estructura poblacional y el patrón de dispersión encontrado se ajusta al modelo metapoblacional propuesto por Vera *et al.* (2010b) y Sanz *et al.* (2011) para las poblaciones de Trucha Común mediterráneas. En este escenario, cada río actuaría como una metapoblación que evolucionaría de manera independiente debido a su aislamiento poblacional, con subpoblaciones cuyo tamaño y estabilidad en el tiempo dependerán del reclutamiento y del intercambio de ejemplares.
11. El alto nivel de estructuración genética detectado sugiere que cada cuenca está compuesta por más de un acervo genético, con un intercambio entre ellas muy reducido debido a la elevada fragmentación del hábitat, observándose algunos ríos más próximos genéticamente a ríos geográficamente más lejanos que a aquellos más cercanos geográficamente. Estos ríos o conjuntos de ríos habrían sido colonizados por diferentes poblaciones separadas en el tiempo, con numerosos procesos de colonización por dispersión y capturas fluviales.

Capítulos IV y V:

12. La alta diversidad existente en los ríos suribéricos es el resultado de una compleja historia evolutiva, consecuencia de la historia paleogeográfica y climática del sur de la Península Ibérica, así como a procesos de dispersión, vicarianza, extinción y contactos secundarios junto con expansiones poblacionales postglaciales, fuertes cuellos de botella y procesos de deriva genética pasados y actuales.

Capítulo V:

13. Los resultados filogenéticos obtenidos no han permitido confirmar o desmentir el origen asiático postulado para la especie, ni esclarecer las relaciones filogenéticas entre los cinco linajes evolutivos definidos para la Trucha Común, por lo que sus relaciones deberían ser nuevamente revisadas.
14. Las grandes subdivisiones filogeográficas y el origen de los linajes evolutivos parece estar asociado a la evolución geomorfológica de todo el área circum-mediterránea durante el Mioceno. La presencia de las barreras orogénicas presentes en este período crearían los escenarios apropiados para la separación alopátrica de las cinco líneas evolutivas definidas para la Trucha Común.
15. Los resultados obtenidos han desplazado el centro de origen de la línea *Adriática* desde la zona adriática postulada por Bernatchez (2001) y Cortey *et al.* (2004) al mediterráneo occidental, compartiendo su área ancestral con el linaje *Mediterráneo*. El origen común

de ambas líneas evolutivas se encontraría en la región formada por la Península Ibérica mediterránea austral y oriental, sur de Francia, Península Itálica e islas.

16. El descenso de las temperaturas en el Plioceno, y en especial las glaciaciones del Cuaternario, han influido notablemente en la diversificación de la Trucha Común, añadiendo mayor complejidad a su historia evolutiva. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que los períodos glaciales e interglaciales durante el Pleistoceno actuaron de manera distinta sobre ambos linajes, ya sea por diferentes presiones evolutivas, patrones ecológicos o modificaciones paleogeográficas a las que fueron sometidos.
17. Los ríos suribéricos habrían sido colonizados por el linaje *Adriático* durante el Mioceno y Pleistoceno, en dos momentos diferenciados en el tiempo, mientras que la línea *Mediterránea* habría colonizado el sur de la Península Ibérica tras finalizar la crisis salina del Messiniense durante el Plioceno-Pleistoceno, produciéndose numerosos contactos secundarios entre estos linajes durante las glaciaciones del Cuaternario.
18. Las cuencas suribéricas muestran un patrón de colonización y diversificación de la especie asociado mayoritariamente al Pleistoceno, con varios eventos de dispersión y vicarianza relacionados con los cambios de temperatura global durante este período. Salvo excepciones, los cursos hidrográficos del sur de la Península Ibérica habrían sido colonizados durante este período por procesos de captura fluvial y/o dispersión dentro de las propias cuencas o través del mar Mediterráneo.
19. Las poblaciones suribéricas de Trucha Común son muy antiguas, presentan variantes haplotípicas y alélicas únicas y patrones reproductivos adaptados a su hábitat. A pesar de su elevado valor biológico, el estado de conservación genético es muy pobre. Por lo tanto, la implantación de medidas de protección y recuperación de estas poblaciones deberían ser prioritarias para la recuperación de la especie en el sur de la Península Ibérica, al fin de evitar un mayor deterioro de su integridad genética.

VII. DIRECTRICES DE GESTIÓN Y CONSERVACIÓN

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han sido empleados a nivel práctico para proponer directrices de gestión y conservación en las poblaciones Trucha Común en la Comunidad Autónoma de Andalucía, dentro del conjunto de actuaciones que está desarrollando la Consejería de Medio Ambiente desde el 2005 dentro del Programa de Recuperación de la especie en el sur de la Península Ibérica. Por ello, se han incluido en este manuscrito las principales recomendaciones de gestión población propuestas según los resultados obtenidos, siendo expuestas de manera pormenorizada dentro de los informes técnicos elaborados por Almodóvar *et al.* (2007, 2009). A grandes rasgos, las poblaciones ibéricas presentan los mismos problemas de conservación, por lo que las pautas de gestión descritas podrían ser extrapoladas a otras poblaciones. Sin embargo, es preciso destacar que las políticas de gestión de aguas continentales difieren de una Comunidad a otra, con su impacto directo sobre la fauna dulceacuícola. Además, la Trucha Común presenta una gran diversidad genética y fenotípica en la Península Ibérica, por lo que debería ser evaluado cada caso aisladamente para proponer políticas de gestión y conservación asociadas a las características particulares de cada río o cuenca.

Los resultados genéticos obtenidos en la presente Tesis, así como los estudios previos realizados en poblaciones de Trucha Común, han mostrado la existencia de flujo genético entre las truchas de repoblación y las truchas nativas. Esto indica que se producen cruzamientos en el río entre las truchas alóctonas y autóctonas, con la consecuente entrada de material genético alóctono en las poblaciones nativas. Por ello, las repoblaciones efectuadas con truchas de procedencia alóctona no deberían reiniciarse, o en aquellos casos que aún se produzcan deberían suspenderse de manera definitiva, evitando de esta manera la contaminación genética foránea en las poblaciones naturales. Desde el cese de las repoblaciones debería realizarse un seguimiento a largo plazo de la introgresión genética en los ríos afectados con el objeto de poder evaluar de manera precisa el tiempo que tardan en desaparecer los genes foráneos de las poblaciones nativas y conocer su capacidad de recuperación, así como determinar los problemas que pueden existir en las poblaciones donde no se ha experimentado un descenso o incluso se ha observado un aumento de los niveles de introgresión.

Como medida general, la repoblación debería considerarse únicamente como una medida de gestión apropiada para restaurar poblaciones nativas en tramos que estén en inminente peligro de extinción o haya desaparecido la especie, y donde otras medidas como la restauración del hábitat fluvial o la recuperación de las áreas de freza hayan resultado ineficaces. Ha existido una predisposición en las últimas décadas por parte de diversas Comunidades Autónomas por repoblar utilizando líneas autóctonas, que debería considerarse la única opción posible si fuera absolutamente necesario llevar a cabo esta medida.

En el caso de tener que recurrir a repoblar determinados tramos se deberían utilizar líneas autóctonas para producir el material de repoblación y convendría tener un programa de seguimiento posterior para evaluar su eficacia. Las líneas autóctonas deberían proceder de ejemplares reproductores de ríos con características genéticas similares. Los ejemplares obtenidos de las líneas únicamente se podrían emplear para repoblar ríos de las mismas características y siguiendo las precauciones descritas a continuación. En primer lugar, las líneas

desarrolladas que presenten introgresión genética no deberían emplearse de ningún modo para fines de repoblación. No es recomendable repoblar con líneas autóctonas sin realizar un análisis comparado previo de las características genéticas de las poblaciones de origen y destino, ya que existe una elevada diversidad de haplotipos y alelos nativos en las cuencas, muchos de ellos exclusivos de determinados ríos. Desde el punto de vista genético, las repoblaciones de truchas entre distintas cuencas pueden llegar a ser tan negativas como las realizadas con truchas de piscifactoría, ya que la distancia genética entre estas poblaciones distintas es mayor que la distancia existente entre algunas poblaciones naturales y las truchas procedentes de piscifactoría. Una de las acciones que deberían emprenderse es el establecimiento de Reservas o Refugios Genéticos en aquellas zonas donde existan poblaciones de Trucha Común autóctona en buen estado de conservación y que presenten haplotipos y/o alelos únicos.

Como paso previo a la producción de líneas autóctonas se debería realizar un estudio genético pormenorizado de los reproductores procedentes del medio natural, con el fin de verificar la ausencia de introgresión genética, así como la existencia de los haplotipos y alelos de la línea seleccionada. En aquellos ríos donde se realicen repoblaciones con individuos procedentes de líneas autóctonas sería necesario llevar a cabo un seguimiento a largo plazo para valorar los efectos ecológicos de las repoblaciones y evaluar los cambios producidos en las poblaciones de destino. En la actualidad apenas existen en España estudios que analicen la eficacia de las repoblaciones con ejemplares autóctonos. En cambio, existe un gran interés por los organismos encargados de la gestión y conservación de los sistemas fluviales y su fauna en conocer dichos efectos, para evaluar la viabilidad de los ejemplares autóctonos producidos en piscifactoría y conocer su efecto real en las poblaciones nativas.

En el caso de las poblaciones suribéricas, según los resultados obtenidos a partir de la región control mitocondrial, Almodóvar *et al.* (2007) sugirieron que para la repoblación de los ríos andaluces deberían emplearse 5 líneas de reproductores, 3 *Adriática-Suribérica* (**AD_{SI}1**, **AD_{SI}4** y **AD_{SI}5**) y dos *Mediterránea-Ibérica* (**ME_{MI}1** y **ME_{MI}2**). Sin embargo, el análisis de los loci microsatélites ha revelado un importante grado de diferenciación genética entre las poblaciones de Trucha Común en el sur de la Península Ibérica. En particular, la mayor diferenciación poblacional se da entre ríos, constituyendo grupos genéticamente diferenciados formados por ríos o grupos de ríos de distintas cuencas, lo que sugiere la existencia de un potencial adaptativo estructurado, cuya conservación debería ser prioritaria. Además, la elevada diferenciación entre poblaciones dentro de las cuencas dificulta el desarrollo de líneas autóctonas, que se plantea mucho más complejo que el basado únicamente en el análisis del ADN mitocondrial.

Por todo lo anterior, antes de recurrir a las medidas de repoblación, sería necesario identificar los factores responsables que han ocasionado el declive de las poblaciones e intentar su recuperación con medidas tales como la mejora del hábitat fluvial, la calidad del agua o la utilización de alternativas de gestión de la pesca deportiva que permitan un uso sostenible de las poblaciones naturales. En esta línea y teniendo en cuenta la regresión de la especie observada en los últimos años, la Junta de Andalucía ha establecido como medida de protección la pesca sin muerte de la Trucha Común en todo Andalucía. Además, la especie está catalogada como “En

peligro de extinción” en el Libro Rojo de los Vertebrados de Andalucía. Sería necesario mantener esta medida hasta que las poblaciones muestren signos de recuperación mediante un programa de seguimiento.

Por otra parte, con el fin de evitar la fragmentación de las poblaciones y permitir el acceso de los reproductores a las zonas de freza, así como los movimientos de truchas entre los distintos tramos de los ríos, sería recomendable la eliminación de las presas que actualmente están en desuso y resultan infranqueables para los peces. Además, en el resto de presas se deberían mejorar los pasos para peces existentes que resulten ineficaces, así como establecer nuevos pasos en las presas donde actualmente no existan.

Como muestran los resultados de la presente Tesis, así como los obtenidos en estudios previos realizados en otras zonas de España, la conservación de la Trucha Común como especie no es suficiente, ya que su potencial evolutivo está representado por su variabilidad genética entre las distintas poblaciones, que debe ser también conservada. En este contexto, los esfuerzos de conservación deberían dirigirse a las diferentes líneas evolutivas existentes, que están representadas por aquellas poblaciones o conjuntos de poblaciones con una historia evolutiva independiente y características genéticas únicas que contribuyen sustancialmente a la diversidad genética total.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abell, R., Thieme, M.L., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N., Coad, B., Mandrak, N., Contreras, S., Stiassny, M.J., Skelton, P., Allen, G.R., Unmack, P., Naseka, A., Rebecca, N.G., Sindorf, N., Robertson, J., Armijo, E., Higgins, J.V., Heibel, T.J., Wikramanayake, E., Olson, D., López, H.L., Reis, R.E., Lundberg, J.G. Sabaj, M.H. y Petry, P. 2008. Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *BioScience* 58: 403–414.
- Abellán, P., Sánchez-Fernández, D., Picazo, F., Millán, A., Lobo, J.M. y Ribera, I. 2013. Preserving the evolutionary history of freshwater biota in Iberian National Parks. *Biological Conservation* 162: 116–126.
- Abels, H., Hilgen, F., Krijgsman, W., Kruk, R., Raffi, I., Turco, E. y Zachariasse, W. 2005. Long-period orbital control on middle Miocene global cooling: Integrated stratigraphy and astronomical tuning of the Blue Clay Formation on Malta. *Paleogeography* 20: PA4012.
- Adkison, M.D. 1995. Population differentiation in Pacific Salmons: local adaptation genetic drift, or the environment? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52: 2762–2777.
- Akaike, H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. En: “*Second International Symposium on Information Theory*”. Petrov, B.N. y Csaki, F. (eds.). Budapest: Akademiai Kiadó, pp: 267–281.
- Allendorf, F.W. y Leary, R.F. 1988. Conservation and distribution of genetic variation in a polytypic species, the cutthroat trout. *Conservation Biology* 2: 170–184.
- Allendorf, F. y Seeb, L. 2000. Concordance of genetic divergence among sockeye Salmon populations at allozyme, nuclear DNA, and mitochondrial DNA markers. *Evolution* 54: 640–651.
- Allendorf, F.W. y Ryman, N. 2002. The role of genetics in population viability analysis. En: “*Population viability analysis*”. Beissinger, S.R. y McCullough, D.R. (eds.). Chicago University Press, Chicago, pp: 50–85.
- Allendorf, F., Ryman, N., Stennek, A. y Ståhl, G. 1976. Genetic variation in Scandinavian brown trout (*Salmo trutta* L.): evidence of distinct sympatric populations. *Hereditas* 83: 73–82.
- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P. y Wenburg, J.K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology y Evolution* 16: 613–622.
- Almada, V. y Sousa-Santos, C. 2010. Comparisons of the genetic structure of *Squalius* populations (*Teleostei*, *Cyprinidae*) from rivers with contrasting histories, drainage areas and climatic conditions based on two molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 924–31.
- Almodóvar, A. 1999. Variabilidad ecológica de la Trucha Común *Salmo trutta* en el centro de España. Implicaciones para su conservación y gestión. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 508 pp.
- Almodóvar, A. 2002. La Trucha Común hacia una nueva estrategia de conservación. En: “*Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*”. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid, pp: 303–311.
- Almodóvar, A. y Nicola, G.G. 1999. Effects of a small hydropower station upon Brown trout *Salmo trutta* L. in the river Hoz Seca (Tagus basin, Spain) one year after regulation. *Regulated River: Research y Management* 15: 477–484.

- Almodóvar, A., Machordom, A. y Suárez, J. 2000. Preliminary results from characterization of the iberian Peninsula sturgeon based on analysis of the mtDNA cytochrome b. *Boletín Instituto Español de Oceanografía* 16: 17–27.
- Almodóvar, A., Suárez, J., Nicola, G.G. y Nuevo, M. 2001. Genetic introgression between wild and stocked brown trout in the Douro river basin, Spain. *Journal of Fish Biology* 59 (Supplement A): 68–74.
- Almodóvar, A., Nicola, G.G. y Suárez, J. 2002. Effects of fishery management on populations of brown trout *Salmo trutta* in central Spain. En: “*Freshwater fish conservation: options for the future*”. Collares-Pereira, M.J. y Coelho, M.M. (eds.). Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, pp: 337–345.
- Almodóvar, A., Nicola, G.G., Elvira, B. y García-Marin, J.L. 2006. Introgression variability among iberian brown trout Evolutionary Significant Units: the influence of local management and environmental features. *Freshwater Biology* 51: 1175–1187.
- Almodóvar, A., Nicola, G.G., Elvira, B. y Leal, S. 2007. *Análisis y caracterización de las poblaciones de Trucha Común en Andalucía*. Informe inédito. Convenio EGMASA-Junta de Andalucía y Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 139 pp.
- Almodóvar, A., Nicola, G.G., Ayllón, D. y Elvira, B. 2012. Global warming threatens the persistence of mediterranean brown trout. *Global Change Biology* 18: 1549–1560.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.
- Altukhov, Y.P. y Salmenkhova, E.A. 1990. Introductions of distinct stocks of chum Salmon, *Oncorhynchus keta* (Walbaum) into natural populations of the species. *Journal of Fish Biology* 37: 25–33.
- Antunes, A., Alexandrino, P. y Ferrand, N. 1999. Genetic characterization of Portuguese brown trout (*Salmo trutta* L.) and comparison with other european populations. *Ecology of Freshwater Fish* 8: 194–200.
- Antunes, A., Faria, R., Weiss, S. y Alexandrino, P. 2001. Complex evolutionary history in the brown trout: Insights on the recognition of conservation units. *Conservations Genetics* 2: 223–347.
- Antunes, A., Templeton, A.R., Guyomard, R. y Alexandrino, P. 2002. The role of nuclear gene in intraspecific evolutionary inference: genealogy of the transferrin gene in the brown trout. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1272–1287.
- Antunes, A., Faria, R., Warren, E., Guyomard, R. y Alexandrino, P. 2006. Life on the Edge: The long-term persistence and contrasting spatial genetic structure of distinct Brown Trout life histories at their ecological limits. *Journal of Heredity* 97: 193–205.
- Aparicio, E., García-Berthou, E., Araguas, R.M., Martínez, P. y García-Marín, J.L. 2005. Body pigmentation pattern to assess introgression by hatchery stocks in native *Salmo trutta* from mediterranean streams. *Journal of Fish Biology* 67: 931–949.
- Apostolidis, A., Karakousis, Y. y Triantaphyllidis, C. 1996. Genetic divergence and phylogenetic relationships among *Salmo trutta* L. (brown trout) populations from Greece and other european countries. *Heredity* 76: 551–560.
- Apostolidis, A.P., Triantaphyllidis, C., Kouvatsi, A. y Economidis, P.S. 1997. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. *Molecular Ecology* 6: 531–542.

- Apostolidis, A.P., Madeira, M.J., Hansen, M.M. y Machordom, A. 2008a. Genetic structure and demographic history of brown trout (*Salmo trutta*) populations from the southern Balkans. *Freshwater Biology* 53: 1555–1566.
- Apostolidis, A.P., Loukovitis, D. y Tsigenopoulos, C.S. 2008b. Genetic characterization of brown trout (*Salmo trutta*) populations from the southern Balkans using MtDNA sequencing and RFLPs analysis. *Hydrobiologia* 600: 169–176.
- Apostolidis, A.P., Stoumboudi, M.T., Kalogianni, E. y Cote, G. 2011. Genetic divergence among native trout *Salmo trutta* populations from southern Balkans based on mitochondrial DNA and microsatellite. *Journal of Fish Biology* 79: 1950–1960.
- Araguas, R. y Sanz, N. 2004. Breakdown of the brown trout evolutionary history due to hybridization between native and cultivated fish. *Journal of Fish Biology* 65: 28–37.
- Araguas, R.M., Sanz, N., Fernández, R., Utter, F.M., Pla, C. y García-Marín, J.-L. 2008. Genetic refuges for a self-sustained fishery: experience in wild brown trout populations in the eastern Pyrenees. *Ecology of Freshwater Fish* 17: 610–616.
- Araguas, R.M., Sanz, N., Fernandez, R., Utter, F.M., Pla, C. y Garcia-Marin, J.L. 2009. Role of genetic refuges in the restoration of native gene pools of brown trout. *Conservation Biology* 23: 871–878.
- Arias, J. 1996. Análisis alozimico de la estructura genética de trucha común (*Salmo trutta* L.): implicaciones para la gestión de los recursos de esta especie en Galicia. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, 208 pp.
- Arias, J., Sánchez, L. y Martínez, P. 1995. Low stocking incidence in brown trout populations from north-western Spain monitored by *LDH-5** diagnostic marker. *Journal of Fish Biology* 47: 170–176.
- Armstrong, J.D., Kemp, P.S., Kennedy, G.J.A., Ladle, M. y Milner, N.J. 2003. Habitat requirements of atlantic Salmon and brown trout in rivers and streams. *Fisheries Research* 62: 143–170.
- Aurelle, D. y Berrebi, P. 2001. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta*, L.) populations from south-western France: data from mitochondrial control region variability. *Molecular Ecology* 10: 1551–1561.
- Aurelle, D., Cattaneo-Berrebi, G. y Berrebi, P. 2002. Natural and artificial secondary contact in brown trout (*Salmo trutta* L.) in the French western Pyrenees assessed by allozymes and microsatellites. *Heredity* 89: 171–183.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, 684 pp.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C. y Saunders, N. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondria DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 18: 489–522.
- Ayllón, F., Morán, P., García-Vazquez, E., Ayllon, F. y Moran, P. 2006. Maintenance of a small anadromous subpopulation of brown trout (*Salmo trutta* L.) by straying. *Freshwater Biology* 51: 351–358.
- Babbucci, M., Buccoli, S., Cau, A., Cannas, R., Goni, R., Diaz, D., Marcato, S., Zane, L. y Patarnello, T. 2010. Population structure, demographic history, and selective processes: Contrasting evidences from mitochondrial and nuclear markers in the european spiny lobster *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 1040–1050.

- Ballard, J. y Whitlock, M. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729–744.
- Balloux, F. y Goudet, J. 2002. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. *Molecular Ecology* 11: 771–783.
- Balloux, F. y Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155–65.
- Bănărescu, P. 1973. Origin and affinities of the freshwater fish fauna of Europe. *Ichthyologia* 5: 1–8.
- Bănărescu, P.M. 1989. Vicariant patterns and dispersal in european freshwater fishes. *Spixiana. Munchen* 12: 91–103.
- Baric, S., Riedl, A., Meraner, A., Medgyesy, N., Lackner, R., Pelster, B. y Dalla, V. 2010. Alpine headwater streams as reservoirs of remnant populations of the Danubian clade of brown trout. *Freshwater Biology* 55: 866–880.
- Barson, N.J., Haugen, T.O., Vøllestad, L.A. y Primmer, C.R. 2009. Contemporary isolation-by-distance, but not isolation-by-time, among demes of european grayling (*Thymallus thymallus*, Linnaeus) with recent common ancestors. *Evolution; international journal of organic evolution* 63: 549–556.
- Beerli, P. 2009. How to use MIGRATE or why are Markov chain Monte Carlo programs difficult to use? En: *Population genetics for animal conservation, volumen 17*. Bertorelle, G., Bruford, M., Haue, H., Rizzoli, A. y Vernesi, C. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp: 42–79.
- Behnke, R.J. 1986. Brown trout. *Trout* 27: 42–47.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. y Bonhomme, F. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des population. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier.
- Bernardi, G., Mouchiroud, D. y Gautier, C. 1993. Silent substitutions in mammalian genomes and their evolutionary implications. *Journal of Molecular Evolution* 37: 583–589.
- Bernatchez, L., Guyomard, R. y Bonhomme, F. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote european brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology* 1: 161–173.
- Bernatchez, L. y Osinov, A. 1995. Genetic diversity of trout (Genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial-DNA and nuclear gene variation. *Molecular Ecology* 4: 285–297.
- Bernatchez, L. y Wilson, C.C. 1998. Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic. *Molecular Ecology* 7: 431–452.
- Bernatchez, L. 2001. The Evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analysis of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 55: 351–379.
- Berrebi, P., Povz, M., Jesensek, D., Cattaneo-Berrebi, G. y Crivelli, A.J. 2000. The genetic diversity of native, stocked and hybrid populations of marble trout in the Soca river, Slovenia. *Heredity* 85: 277–287.
- Bianchi, C.N. y Morri, C. 2000. Marine biodiversity of the Mediterranean sea: situation, problems and prospects for future research. *Marine Pollution Bulletin* 40: 367–376.

- Bianco, P. 1990. Potential role of the palaeohistory of the mediterranean and paratethys basins on the early dispersal of euro-mediterranean freshwater fishes. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 1: 167–184.
- Blanchet, S., Loot, G., Grenouillet, G. y Brosse, S. 2007. Competitive interactions between native and exotic *Salmonids*: a combined field and laboratory demonstration. *Ecology of Freshwater Fish* 16: 133–143.
- Blanco, G., Cagigas, E., Vázquez, E. y Sánchez, J.A. 1998. Genetic impact of introduced domesticated strains of brown trout, *Salmo trutta*, on native Spanish populations. En: *Stocking and Introduction of Fish*. Cowx, I.G. (eds.). Fishing News Books, Blackwell Science, London, pp: 371–379
- Blondel, J., Aronson, J., Bodiou, J.-Y. y Boeuf, G. 2010. *The mediterranean region: biological diversity in space and time*. Oxford University Press Inc., New York, 376 pp.
- Bofkin, L. y Goldman, N. 2007. Variation in evolutionary processes at different codon positions. *Molecular Biology and Evolution* 24: 513–521.
- Bouza, C., Arias, J., Castro, J., Sánchez, L. y Martínez, P. 1999. Genetic structure of brown trout, *Salmo trutta* L., at the southern limit of the distribution range of the anadromous form. *Molecular Ecology* 8: 1991–2001.
- Bouza, C., Castro, J., Sánchez, L. y Martínez, P. 2001. Allozymic evidence of parapatric differentiation of brown trout (*Salmo trutta* L.) within an atlantic river basin of the iberian Peninsula. *Molecular Ecology* 10: 1455–1469.
- Britten, R.J. 1986. Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science* 231: 1393–1398.
- Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., da Fonseca, G.A.B., Gerlach, J., Hoffmann, M., Lamoreux, J.F., Mittermeier, C.G., Pilgrim, J.D. y Rodrigues, A.S.L. 2006. Global biodiversity conservation priorities. *Science* 313: 58–61.
- Broquet, T. y Petit, E.J.E. 2009. Molecular estimation of dispersal for ecology and population Genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 193–216.
- Burridge, C., Craw, D. y Waters, J. 2006. River capture, range expansion, and cladogenesis: the genetic signature of freshwater vicariance. *Evolution* 60: 1038–1049.
- Cagigas, M.E., Vazquez, E., Blanco, G. y Sanchez, J.A. 2002. Phylogeographical lineages in brown trout (*Salmo trutta*): investigating microgeographical differentiation between native populations from Northern Spain. *Freshwater Biology* 47: 1879–1892.
- Cagigas, M.E., Vazquez, E., Blanco, G. y Sánchez, J.A. 1999. Combined assessment of genetic variability in populations of Brown Trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites, and RAPD markers. *Marine Biotechnology* 1: 286–296.
- Cambray, J. 2003. Impact on indigenous species biodiversity caused by the globalisation of alien recreational freshwater fisheries. *Hydrobiologia* 500: 217–230.
- Campos, J.L., Posada, D. y Morán, P. 2006. Genetic variation at MHC, mitochondrial and microsatellite loci in isolated populations of Brown trout (*Salmo trutta*). *Conservations Genetics* 7: 515–530.
- Campos, J.L., Posada, D., Caballero, P. y Moran, P. 2007. Spatio-temporal genetic variability in sea trout (*Salmo trutta*) populations from north-western Spain. *Freshwater Biology* 52: 510–524.

- Campton, D. y Johnston, J. 1985. Electrophoretic evidence for a genetic admixture of native and nonnative rainbow trout in the Yakima river, Washington. *Transactions of the American Fisheries Society* 114: 782–793.
- Caputo, V., Giovannotti, M., Cerioni, P.N., Splendiani, A. y Olmo, E. 2009. Chromosomal study of native and hatchery trouts from Italy (*Salmo trutta* complex, *Salmonidae*): conventional and FISH analysis. *Cytogenetic and Genome Research* 124: 51–62.
- Carlsson, J. y Nilsson, J. 2000. Population genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) within a northern boreal forest stream. *Hereditas* 132: 173–181.
- Carlsson, J., Olsén, K., Nilsson, J., ØVerli, Ø. y Stabell, O. 1999. Microsatellites reveal fine-scale genetic structure in streamliving brown trout. *Journal of Fish Biology* 55: 1290–1303.
- Carrea, C., Anderson, L. V, Craw, D., Waters, J.M. y Burrige, C.P. 2013. The significance of past interdrainage connectivity for studies of diversity, distribution and movement of freshwater-limited taxa within a catchment. *Journal of Biogeography* 41: 536–547.
- Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540–552.
- Caudron, A., Champigneulle, A., Guyomard, R. y Largiadèr, C.R. 2011. Assessment of three strategies practiced by fishery managers for restoring native brown trout (*Salmo trutta*) populations in Northern French Alpine Streams. *Ecology of Freshwater Fish* 20: 478–491.
- Caudron, A., Champigneulle, A., Vigier, L., Hamelet, V. y Guyomard, R. 2012. Early effects of the strategies of creating a genetic refuge and direct translocation for conserving and restoring populations of native brown trout. *Freshwater Biology* 57: 1702–1715.
- Cavalli-Sforza, L.L. y Edwards, A.W.F. 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19: 233–57.
- Charlesworth, B. 1994. *Evolution in age-structured populations*. Cannings, C., Hoppensteadt, F.C. y Segel, L.A. (eds.). Cambridge University Press Cambridge, 291 pp.
- Chaturvedi, A., Mohindra, V., Singh, R.K., Lal, K.K., Punia, P., Bhaskar, R., Mandal, A., Narain, L. y Lakra, W.S. 2011. Population genetic structure and phylogeography of cyprinid fish, *Labeo dero* (Hamilton, 1822) inferred from allozyme and microsatellite DNA marker analysis. *Molecular Biology Reports* 38: 3513–3529.
- Clavero, M. y García-Berthou, E. 2005. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends in Ecology y Evolution* 20: 110.
- Clement, M., Posada, D. y Crandall, K. a. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.
- Consuegra, S., de Leaniz, C.G., Serdio, A., Morales, M.G., Straus, L.G., Knox, D. y Verspoor, E. 2002. Mitochondrial DNA variation in Pleistocene and modern atlantic salmon from the iberian glacial refugium. *Molecular Ecology* 11: 2037–2048.
- Cooper, S.J.B. y Hewitt, G.M. 1993. Nuclear DNA sequence divergence between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Insect Molecular Biology* 2: 185–194.
- Cornuet, J.M.M. y Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001–2014.
- Cortey, M. 2005. Filogeografia de la truita comuna (*Salmo trutta*) basada en la diversitat molecular del DNA mitocondrial. Tesis Doctoral, Universitat de Girona, 115 pp.

- Cortey, M., Pla, C. y García-Marín, J.L. 2004. Historical biogeography of mediterranean trout. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 831–844.
- Cortey, M., Vera, M. y Pla, C. 2009. Northern and southern expansions of atlantic brown trout (*Salmo trutta*) populations during the Pleistocene. *Society* 97: 904–917.
- Corujo, M., Blanco, G., Vázquez, E. y Sánchez, J. a. 2004. Genetic structure of northwestern Spanish brown trout (*Salmo trutta* L.) populations, differences between microsatellite and allozyme loci. *Hereditas* 141: 258–71.
- Costedoat, C. y Pech, N. 2005. Evolution of mosaic hybrid zone between invasive and endemic species of *Cyprinidae* through space and time. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 135–155.
- Costello, A., Down, T., Pollard, S., Pacas, C. y Taylor, E. 2003. The influence of history and contemporary stream hydrology on the evolution of genetic diversity within species: an examination of microsatellite DNA variation in bull trout, *Salvelinus confluentus* (Pisces: Salmonidae). *Evolution* 57: 328–344.
- Cowx, I.G. 1994. Stocking strategies. *Fisheries Management and Ecology* 1: 15–30.
- Crandall, K.A. y Templeton, A.R. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with application to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959–969.
- Crespi, B.J. y Fulton, M.J. 2004. Molecular systematics of *Salmonidae*: combined nuclear data yields a robust phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 658–679.
- Crête-Lafrenière, A., Weir, L.K. y Bernatchez, L. 2012. Framing the *Salmonidae* family phylogenetic portrait: a more complete picture from increased taxon sampling. *PloS One* 7: e46662.
- Cross, T.F., Mills, C.P.R. y Courcy Williams, M. de. 1992. An intensive study of allozyme variation in freshwater resident and anadromous trout, *Salmo trutta* L., in western Ireland. *Journal of Fish Biology* 40: 25–32.
- Crozier, W.W. 1993. Evidence of genetic interaction between escaped farmed Salmon and wild atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a northern Irish river. *Aquaculture* 113: 19–29.
- Cunha, C., Coelho, M.M., Carmona, J.A. y Doadrio, I. 2004. Phylogeographical insights into the origins of the *Squalius alburnoides* complex via multiple hybridization events. *Molecular Ecology* 13: 2807–2817.
- Cuttelod, A., García, N., Abdul Malak, D., Temple, H. y Katariya, V. 2009. The Mediterranean: a biodiversity hotspot under threat. En: *Wildlife in a changing world: an analysis of the 2008 IUCN Red List of threatened species*. Vié, J.C., Hilton-Taylor, C. y Stuart, S.N. (eds.). IUCN, Gland, pp: 89-101
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. y Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- De Galdeano, C. y Alfaro, P. 2004. Tectonic significance of the present relief of the Betic cordillera. *Geomorphology* 63: 175–190.
- De Galdeano, C. y Vera, J. 1991. Una propuesta de clasificación de las cuencas neógenas béticas. *Acta Geológica Hispánica* 26: 205–227.
- De Galdeano, C.S. y López-Garrido, A. 2000. Las fallas tortonienses a cuaternarias entre Granada y la costa: el límite occidental del nevado-filábride y de las unidades alpujárrides inferiores. *Revista de la Sociedad Geológica de España* 13: 519–528.

- Degnan, S. 1993. The perils of single gene trees—mitochondrial versus single-copy nuclear DNA variation in white-eyes (*Aves: Zosteropidae*). *Molecular Ecology* 2: 219–225.
- Doadrio, I. 2002. *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza (DGCN), Madrid, 374 pp.
- Doadrio, I. y Casado, P. 1989. Nota sobre la ictiofauna continental de los yacimientos de la cuenca de Guadix-Baza (Granada). En: *Geología y Paleontología de la Cuenca de Guadix-Baza. Trabajos sobre el Neogeno Cuaternario, voi.11*. Alberdi, M. y Bonadonna, F. (eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, pp: 139-150.
- Doadrio, I. y Carmona, J.A. 2003. Testing freshwater Lago Mare dispersal theory on the phylogeny relationships of iberian cyprinid genera *Chondrostoma* and *Squalius* (*Cypriniformes, Cyprinidae*). *Graellsia* 59: 457–473.
- Doadrio, I. y Carmona, J.A. 2004. Phylogenetic relationships and biogeography of the genus *Chondrostoma* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 802–815.
- Doadrio, I., Perdices, A. y Machordom, A. 1996a. Allozymic variation of the endangered killifish *Aphanius iberus* and its application to conservation. *Environmental Biology of Fishes* 45: 259–271.
- Doadrio, I., Gutiérrez, B. y Perdices, A. 1996b. *Caracterización genética de algunas poblaciones de Salmo trutta en el SE de España*. Informe inédito. 39 pp.
- Doadrio, I., Perea, S., Garzón-Heydt, P. y González, J.L. 2011. *Ictiofauna continental española. Bases para su seguimiento*. DG Medio Natural y Política Forestal. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, 616 pp.
- Dodson, J.J., Gibson, R.J., Cunjak, R.A., Friedland, K.D., Garcia de Leaniz, C., Gross, M.R., Newbury, R., Nielsen, J.L., Power, M.E. y Roy, S. 1998. Elements in the development of conservation plans for atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 312–323.
- Domanico, M.J., Phillips, R.B. y Oakley, T.H. 1997. Phylogenetic analysis of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) using nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 1865–1872.
- Donaldson, K.A. y Wilson Jr, R.R. 1999. Amphi-Panamic geminates of the divergence rate in the mitochondrial DNA control region of fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 208–213.
- Dos Reis, M. y Yang, Z. 2011. Approximate likelihood calculation on a phylogeny for Bayesian estimation of divergence times. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2161–2172.
- Drummond, A.J., Simon, Y.W.H., Phillips, M.J. y Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *Plos Biology* 4: 699–710.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Thierer, T. y Wilson, A. 2009. Geneious Pro v4.8.3. Biomatters, Ltd, Auckland. <http://www.geneious.com/>.
- Drummond, A.J., Suchard, M. a, Xie, D. y Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973.
- Dubut, V., Fouquet, A., Voisin, A., Costedoat, C., Chappaz, R. y Gilles, A. 2012. From Late Miocene to Holocene: processes of differentiation within the *Telestes* genus (*Actinopterygii: Cyprinidae*). *PloS One* 7: e34423.

- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M.L.J y Sullivan, C.A. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 81: 163–182.
- Eiting, T.P. y Smith, G.R. 2007. Miocene Salmon (*Oncorhynchus*) from Western North America: Gill Raker evolution correlated with plankton productivity in the Eastern Pacific. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 249: 412–424.
- Eldridge, W.H. y Naish, K.A. 2007. Long-term effects of translocation and release numbers on fine-scale population structure among coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Molecular Ecology* 16: 2407–2421.
- Elizaga, E. y Calvo, J. 1988. Evolución sedimentaria de las cuencas lacustres neógenas de la zona prebética (Albacete, España). Relación, posición y efectos del vulcanismo durante la evolución. Interés minero. *Boletín Geológico y Minero* 99: 837–846.
- Elliott, J.M. 1994. *Quantitative ecology and the brown trout*. Oxford Series in Ecology and Evolution, Oxford University Press, New York, 286 pp.
- Elliott, J.M. y Elliott, J.A. 2010. Temperature requirements of atlantic salmon *Salmo salar*, brown trout *Salmo trutta* and Arctic charr *Salvelinus alpinus*: predicting the effects of climate change. *Journal of Fish Biology* 77: 1793–817.
- Elvira, B. 1995. Native and exotic freshwater fishes in Spanish river basins. *Freshwater Biology* 33: 103–108.
- Elvira, B. 1996. Endangered freshwater fish of Spain. In: *Conservation of endangered freshwater fish in Europe*. Kirchhofer, A. y Hefti, D. (eds.). Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pp. 55–61.
- Elvira, B. y Almodóvar, A. 2001. Freshwater fish introductions in Spain: facts and figures at the beginning of the 21st century. *Journal of Fish Biology* 59: 323–331.
- Epifanio, J. y Nielsen, J. 2000. The role of hybridization in the distribution, conservation and management of aquatic species. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 245–251.
- Eschmeyer, W. 2010. *Catalog of Fishes electronic version* (6 May 2010). <http://research.calacademy.org/>.
- Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D. y Guyomard, R. 1993. (CT)(N) and (GT)(N) Microsatellites - A new class of genetic-markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity* 71: 488–496.
- Estoup, A., Rousset, F., Michalakis, Y., Cornuet, J.-M., Adriamanga, M. y Guyomard, R. 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology* 7: 339–353.
- Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. y Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Excoffier, L. 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology* 13: 853–864.

- Excoffier, L. y Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.
- Farris, J.S. 1970. Methods for Computing Wagner Trees. *Systematic Zoology* 19: 83–92.
- Fauquette, S., Suc, J.P., Bertini, A., Popescu, S.-M., Warny, S., Taoufiq, N.B., Villa, M.-J.P., Chikhi, H., Feddi, N., Subally, D., Clauzon, G. y Ferrier, J. 2006. How much did climate force the Messinian salinity crisis? Quantified climatic conditions from pollen records in the mediterranean region. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 238: 281–301.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, 664 pp.
- Felsenstein, J. 2010. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.69. University of Washington, Seattle. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
- Ferguson, A. 1989. Genetic differences among brown trout, *Salmo trutta*, stocks and their importance for the conservation and management of the species. *Freshwater biology* 21: 35–46.
- Ferguson, A. 2007. Genetic impacts of stocking on indigenous brown trout populations. environmental agency, Bristol, 81 pp.
- Ferguson, A. y Mason, F.M. 1981. Allozyme evidence for reproductively isolated sympatric populations of brown trout, *Salmo trutta* L. in Lough Melvin, Ireland. *Journal of Fish Biology* 18: 629–642.
- Ferguson, A. y Taggart, J.B. 1991. Genetic differentiation among the sympatric brown trout (*Salmo trutta*) populations of Lough Melvin, Ireland. *Biological Journal of the Linnean Society* 43: 221–237.
- Fernández-Cebrián, R. 2011. Estructura poblacional y demografía genética en poblaciones de trucha común (*Salmo trutta*) del Pirineo catalán. Tesis Doctoral, Universitat de Girona, 121 pp.
- Filipe, A.F., Araújo, M.B., Doadrio, I., Angermeier, P.L. y Collares-Pereira, M.J. 2009. Biogeography of iberian freshwater fishes revisited: the roles of historical versus contemporary constraints. *Journal of Biogeography* 36: 2096–2110.
- Fitch, W. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology* 20: 406–416.
- Fjellheim, A., Barlaup, B.T., Gabrielsen, S.E. y Raddum, G. 2003. Restoring fish habitat as an alternative to stocking in a river with strongly reduced flow. *Ecohydrology y hydrobiology* 3: 17–26.
- Fleming, I.A., Lamberg, A. y Jonsson, B. 1997. Effects of early experience on the reproductive performance of atlantic salmon. *Behavioral Ecology* 8: 470–480.
- Fleming, I.A. y Petersson, E. 2001. The Ability of released , hatchery *Salmonids* to breed and contribute to the natural productivity of wild populations. *Nordic Journal of Freshwater Research* 75: 71–98.
- Flower, B.P. y Kennett, J.P. 1994. The middle Miocene climatic transition: East Antarctic ice sheet development, deep ocean circulation and global carbon cycling. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 108: 537–555.

- Fontaine, B., van Achterberg, K., Alonso-Zarazaga, M.A., Araujo, R., Asche, M., Aspöck, H., Aspöck, U., Audisio, P., Aukema, B., Bailly, N., Balsamo, M., Bank, R.A., Belfiore, C., Bogdanowicz, W., Boxshall, G., Burckhardt, D., Chylarecki, P., Deharveng, L., Dubois, A., Enghoff, H., Fochetti, R., Fontaine, C., Gargominy, O., Gómez Lopez, M.S., Goujet, D., Harvey, M.S., Heller, K.-G., van Helsdingen, P., Hoch, H., De Jong, Y., Karsholt, O., Los, W., Magowski, W., Massard, J.A., McInnes, S.J., Mendes, L.F., Mey, E., Michelsen, V., Minelli, A., Nieto Nafria, J.M., van Nieukerken, E.J., Pape, T., De Prins, W., Ramos, M., Ricci, C., Roselaar, C., Rota, E., Segers, H., Timm, T., van Tol, J. y Bouchet, P. 2012. New species in the Old World: Europe as a frontier in biodiversity exploration, a test bed for 21st century taxonomy. *PloS One* 7: e36881.
- Franco, A. y Rodríguez, M. 2001. *Libro Rojo de los Vertebrados Amenazados de Andalucía*. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía, Sevilla, 40 pp.
- Frankel, O.H., Brown, A.H. y Burdon, J.J. 1995. *The Conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge University Press Cambridge, Cambridge, 301 pp.
- Frankham, R. 2005. Conservation biology: ecosystem recovery enhanced by genotypic diversity. *Heredity* 95: 183.
- Frankham, R., Ballou, J.D. y Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press Cambridge, Cambridge, 617 pp.
- Fraser, D.J. y Bernatchez, L. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* 10: 2741–2752.
- Fraser, D.J., Weir, L.K., Bernatchez, L., Hansen, M.M. y Taylor, E.B. 2011. Extent and scale of local adaptation in *Salmonid* fishes: review and meta-analysis. *Heredity* 106: 404–20.
- Freyhof, J. 2013. *Salmo trutta*. The IUCN Red List of Threatened Species Version 2014.2. <http://www.iucnredlist.org/>.
- Fritzner, N.G., Hansen, M.M., Madsen, S.S. y Kristiansen, K. 2001. Use of microsatellite markers for identification of indigenous brown trout in a geographical region heavily influenced by stocked domesticated trout. *Journal of Fish Biology* 58: 1197–1210.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Fu, Y.X. y Li, W. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693–709.
- Gante, H.F., Micael, J., Oliva-Paterna, F.J., Doadrio, I., Dowling, T.E. y Alves, M.J. 2009. Diversification within glacial refugia: tempo and mode of evolution of the polytypic fish *Barbus sclateri*. *Molecular Ecology* 18: 3240–3255.
- Gante, H.F., Santos, C.D. y Alves, M.J. 2010. Phylogenetic relationships of the newly described species *Chondrostoma olisiponensis* (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of Fish Biology* 76: 965–974.
- García de Leániz, C., Verspoor, E. y Hawkins, A.D. 1989. Genetic determination of the contribution of stocked and wild atlantic salmon *Salmo salar* L., to the angling fisheries in two Spanish rivers. *Journal of Fish Biology* 35: 261–270.
- García-Marín, J.L. 1992. Diferenciación genética de la trucha común (*Salmo trutta*) en España. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, 173 pp.
- García-Marín, J.L. y Pla, C. 1996. Origins and relationships of native populations of *Salmo trutta* (brown trout) in Spain. *Heredity* 77: 313–323.

- García-Marín, J.L., Jorde, P.E., Ryman, N., Utter, F. y Pla, C. 1991. Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Aquaculture* 95: 235–249.
- García-Marín, J.L., Sanz, N. y Pla, C. 1998. Proportions of native and introduced brown trout in adjacent fished and unfished spanish rivers. *Conservation Biology* 12 (2): 313–319.
- García-Marín, J.L., Sanz, N. y Pla, C. 1999a. Erosion of the native genetic resources of brown trout in Spain. *Ecology of Freshwater Fish* 8: 151–158.
- García-Marín, J.L., Utter, F. y Pla, C. 1999b. Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity* 82: 46–56.
- Garvin, M.R., Saitoh, K., Churikov, D.Y., Brykov, V.A. y Gharrett, A.J. 2010. Single nucleotide polymorphisms in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) mitochondrial DNA derived from restriction site haplotype information. *Genome* 53: 501–507.
- Geiger, M.F., Herder, F., Monaghan, M.T., Almada, V., Barbieri, R., Bariche, M., Berrebi, P., Bohlen, J., Casal-Lopez, M., Delmastro, G.B., Denys, G.P.J., Dettai, A., Doadrio, I., Kalogianni, E., Kärst, H., Kottelat, M., Kovačić, M., Laporte, M., Lorenzoni, M., Marčić, Z., Ozulğ, M., Perdices, A., Perea, S., Persat, H., Porcelotti, S., Puzzi, C., Robalo, J., Sanda, R., Schneider, M., Slechtová, V., Stoumboudi, M., Walter, S. y Freyhof, J. 2014. Spatial heterogeneity in the mediterranean biodiversity hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources* (in press).
- Giuffra, E., Bernatchez, L. y Guyomard, R. 1994. Mitochondrial control region and protein-coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. *Molecular Ecology* 3: 161–171.
- Giuffra, E., Guyomard, R. y Forneris, G. 1996. Phylogenetic relationships and introgression patterns between incipient parapatric species of Italian brown trout (*Salmo trutta* L. complex). *Molecular Ecology* 5: 207–220.
- Gleick, P.H. 1996. Water resources. En: *Encyclopedia of climate and weather*. Schneider, S.H. (eds.). Oxford University Press, New York, pp: 817-823.
- Godinho, R., Crespo, E.G. y Ferrand, N. 2008. The limits of mtDNA phylogeography: complex patterns of population history in a highly structured iberian lizard are only revealed by the use of nuclear markers. *Molecular Ecology* 17: 4670–4683.
- Goloboff, P., Farris, J. y Nixon, K. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 1–13.
- Gómez, A. y Lunt, D.H. 2007. Refugia Within Refugia: Patterns of Phylogeographic Concordance in the iberian Peninsula. En: *Phylogeography of southern european refugia. Evolutionary perspectives on the origins and conservation of european biodiversity*. Weiss, S. y Ferrand, N. (eds.). Springer, Dordrecht, pp: 155–188.
- Gómez-Ortiz, A., Franch, F.S., Torres, M.S., Sánchez, S. y Amat, A.E. 1992. Síntesis de la morfología glacial y periglacial de Sierra Nevada. En: *Estudios de geomorfología en España: Actas de la II Reunión Nacional de Geomorfología*. Murcia, 23-25 de Septiembre 1992, pp. 379–392.
- Gomez-Uchida, D., Knight, T.W. y Ruzzante, D.E. 2009. Interaction of landscape and life history attributes on genetic diversity, neutral divergence and gene flow in a pristine community of *Salmonids*. *Molecular Ecology* 18: 4854–4869.
- Gortázar, J., de Jalon, D.G., Alonso-Gonzalez, C., Vizcaino, P., Baeza, D., Marchamalo, M. 2007. Spawning period of a southern brown trout population in a highly unpredictable stream. *Ecology of Freshwater Fish* 16: 515–527.

- Goudet, J. 1995. Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *Journal of Heredity* 86: 485–486.
- Gozlan, R.E. 2008. Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad? *Fish and Fisheries* 9: 106–115.
- Gratton, P., Allegrucci, G., Gandolfi, A. y Sbordoni, V. 2013. Genetic differentiation and hybridization in two naturally occurring sympatric trout *Salmo* spp. forms from a small karstic lake. *Journal of Fish Biology* 82: 637–657.
- Griffin, D.L. 2002. Aridity and humidity: two aspects of the late Miocene climate of North Africa and the Mediterranean. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 182: 65–91.
- Griffiths, A.M., Koizumi, I., Bright, D. y Stevens, J.R. 2009a. A case of isolation by distance and short-term temporal stability of population structure in brown trout (*Salmo trutta*) within the River Dart, southwest England. *Evolutionary Applications* 2: 537–554.
- Griffiths, A.M., Bright, D. y Stevens, J.R. 2009b. Complete mitochondrial control region sequences indicate a distinct variety of brown trout *Salmo trutta* in the Aral sea. *Journal of Fish Biology* 74: 1136–1142.
- Groom, M.J., Meffe, G.K. y Carroll, C.R. 2006. *Principles of conservation biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 793 pp.
- Gyllensten, U. 1985. The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species. *Journal of Fish Biology* 26: 691–699.
- Hamilton, K.E., Ferguson, A., Taggart, J.B., Tomasson, T., Walker, A. y Fahy, E. 1989. Post-glacial colonization of brown trout, *Salmo trutta* L., Ldh-5 as a phylogeographic marker locus. *Journal of Fish Biology* 35: 651–664.
- Hampe, A. y Petit, R.J. 2005. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters* 8: 461–467.
- Hansen, M.M. 2002. Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: an approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Molecular Ecology* 11: 1003–1015.
- Hansen, M.M. y Mensberg, K.L.D. 1998. Genetic differentiation and relationship between genetic and geographical distance in Danish sea trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Heredity* 81: 493–504.
- Hansen, M.M. y Mensberg, K.-L.L.D. 2009. Admixture analysis of stocked brown trout populations using mapped microsatellite DNA markers: indigenous trout persist in introgressed populations. *Biology Letters* 5: 656–659.
- Hansen, M.M., Hynes, R.A., Loeschke, V. y Rasmussen, G. 1995. Assessment of the stocked or wild origin of anadromous brown trout (*Salmo trutta* L.) in a danish river system, using mitochondrial DNA RFLP analysis. *Molecular Ecology* 4: 189–198.
- Hansen, M.M., Ruzzante, D.E., Nielsen, E.E. y Mensberg, K.-L.D. 2000a. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology* 9: 583–594.
- Hansen, M.M., Nielsen, E.E., Ruzzante, D.E., Bouza, C. y Mensberg, K.D. 2000b. Genetic monitoring of supportive breeding in brown trout (*Salmo trutta* L.) using microsatellite DNA markers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57: 2130–2139.

- Hansen, M.M., Kenchington, E. y Nielsen, E.E. 2001. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers. *Fish and Fisheries* 2: 93–112.
- Hansen, M.M., Ruzzante, D.E., Nielsen, E.E., Bekkevold, D. y Mensberg, K.D. 2002. Long-term effective population sizes, temporal stability of genetic composition and potential for local adaptation in anadromous brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Molecular Ecology* 11: 2523–2535.
- Hansen, M.M., Bekkevold, D., Jensen, L.F., Mensberg, K.D. y Nielsen, E.E. 2006. Genetic restoration of a stocked brown trout *Salmo trutta* population using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Journal of Applied Ecology* 43: 669–679.
- Hansen, M.M., Skaala, O., Jensen, L.F., Bekkevold, D. y Mensberg, K.D. 2007. Gene flow, effective population size and selection at major histocompatibility complex genes: brown trout in the Hardanger Fjord, Norway. *Molecular Ecology* 16: 1413–1425.
- Hansen, M.M., Fraser, D.J., Meier, K. y Mensberg, K.L.D. 2009. Sixty years of anthropogenic pressure: a spatio-temporal genetic analysis of brown trout populations subject to stocking and population declines. *Molecular Ecology* 18: 2549–2562.
- Hansen, M.M., Meier, K. y Mensberg, K.-L.D. 2010. Identifying footprints of selection in stocked brown trout populations: a spatio-temporal approach. *Molecular Ecology* 19: 1787–1800.
- Hansen, M.M., Olivieri, I., Waller, D.M. y Nielsen, E.E. 2012. Monitoring adaptive genetic responses to environmental change. *Molecular Ecology* 21: 1311–1329.
- Harpending, H. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human biology* 66: 591–600.
- Hartmann, K. y André, J. 2012. Should evolutionary history guide conservation? *Biodiversity and Conservation* 22: 449–458.
- Hasegawa, M. y Kishino, H. 1989. Heterogeneity of tempo and mode of mitochondrial DNA evolution among mammalian orders. *Idengaku zasshi* 64: 243–258.
- Hasegawa, M., Kishino, H. y Yano, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160–174.
- Hasegawa, M., Thorne, J.L. y Kishino, H. 2003. Time scale of eutherian evolution estimated without assuming a constant rate of molecular evolution. *Genes y Genetic Systems* 78: 267–283.
- Hashemzadeh Segherloo, I., Farahmand, H., Abdoli, a, Bernatchez, L., Primmer, C.R., Swatdipong, A., Karami, M. y Khalili, B. 2012. Phylogenetic status of brown trout *Salmo trutta* populations in five rivers from the southern Caspian sea and two inland lake basins, Iran: a morphogenetic approach. *Journal of Fish Biology* 81: 1479–1500.
- Haugen, T. y Vøllestad, L. 2000. Population differences in early life-history traits in grayling. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 897–905.
- Head, J. y Gibbard, P. 2005. Early-Middle Pleistocene transitions: An overview and recommendation for the defining boundary. En: *Early-Middle Pleistocene transitions: The land-ocean evidence*. Head, J. y Gibbard, P. (eds.). The Geological Society of London, London, pp: 1–18.
- Hébert, C., Danzman, R., Jones, M. y Bernatchez, L. 2000. Hydrography and population genetic structure in brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Mitchill) from eastern Canada. *Molecular Ecology* 9: 971–982.

- Heggenes, J. y Røed, K.H. 2006. Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. *Ecology of Freshwater Fish* 15: 366–375.
- Heggenes, J., Røed, K.H., Hoyheim, B. y Rosef, L. 2002. Microsatellite diversity assessment of brown trout (*Salmo trutta*) population structure indicate limited genetic impact of stocking in a norwegian alpine lake. *Ecology of Freshwater Fish* 11: 93–100.
- Helfman, G.F. 2007. *Fish conservation: a guide to understanding and restoring global aquatic biodiversity and fishery resources*. Island Press, Washington D.C, 584 pp.
- Hendry, A.P., Nosil, P. y Rieseberg, L.H. 2007. The speed of ecological speciation. *Functional Ecology* 21: 455–464.
- Hennig, W. 1965. Phylogenetic systematics. *Annual Review of Entomology* 10: 97–116.
- Henriques, R., Sousa, V. y Coelho, M.M. 2010. Migration patterns counteract seasonal isolation of *Squalius torgalensis*, a critically endangered freshwater fish inhabiting a typical circum-mediterranean small drainage. *Conservation Genetics* 11: 1859–1870.
- Henry, T. y Ferguson, A. 1985. Kinetic studies on the lactate deshydrogenase (Ldh-C1*) isozymes of brown trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 82: 95–98.
- Hernández Fernández, M., Álvarez Sierra, M.Á. y Peláez-Campomanes, P. 2007. Bioclimatic analysis of rodent palaeofaunas reveals severe climatic changes in southwestern Europe during the Plio-Pleistocene. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 251: 500–526.
- Hewitt, G. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role, in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247–276.
- Hewitt, G. 1999. Post-glacial re-colonization of european biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87–112.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- Hewitt, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 359: 183–195.
- Hilborn, R., Quinn, T.P., Schindler, D.E. y Rogers, D.E. 2003. Biocomplexity and fisheries sustainability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6564–6568.
- Hill, W. 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research* 38: 209–216.
- Hindar, K., Jonsson, B., Ryman, N. y Ståhl, G. 1991. Genetic relationships among landlocked, resident, and anadromous brown trout, *Salmo trutta* L. *Heredity* 66: 83–91.
- Ho, S.Y.W. y Phillips, M.J. 2009. Accounting for calibration uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times. *Systematic Biology* 58: 367–380.
- Hofreiter, M. y Stewart, J. 2009. Ecological change, range fluctuations and population dynamics during the Pleistocene. *Current Biology* 19: R584–R594.
- Höjesjö, J., Økland, F., Sundström, L.F., Pettersson, J. y Johnsson, J.I. 2007. Movement and home range in relation to dominance; a telemetry study on brown trout *Salmo trutta*. *Journal of Fish Biology* 70: 257–268.

- Holder, M. y Lewis, P.O. 2003. Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. *Nature Reviews. Genetics* 4: 275–284.
- Horreo, J., Martinez, J., Ayllón, F., Pola, I., Monteoliva, J., Héland, M. y García-Vázquez, E. 2011. Impact of habitat fragmentation on the genetics of populations in dendritic landscapes. *Freshwater Biology* 56: 2567–2579.
- Hsü, K.J., Montadert, L., Bernoulli, D., Cita, M.B., Erickson, A., Garrison, R.E., Kidd, R.B., Melieres, F., Muller, C. y Wright, R. 1977. History of the mediterranean salinity crisis. *Nature* 267: 399–403.
- Hudson, R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford surveys in evolutionary biology* 7: 1–44.
- Jensen, L.F., Hansen, M.M., Carlsson, J., Loeschcke, V. y Mensberg, K.L.D. 2005. Spatial and temporal genetic differentiation and effective population size of brown trout (*Salmo trutta*, L.) In small danish rivers. *Conservation Genetics* 6: 615–621.
- Jonsson, B. y Jonsson, N. 2011. *Ecology of atlantic salmon and Brown Trout: habitat as a template for life histories*. Fish y Fisheries Series 33. Springer, Dordrecht, 708 pp.
- Jug, T., Berrebi, P. y Snoj, A. 2005. Distribution of non-native trout in Slovenia and their introgression with native trout populations as observed through microsatellite DNA analysis. *Biological Conservation* 123: 381–388.
- Kanno, Y., Vokoun, J.C. y Letcher, B.H. 2011. Fine-scale population structure and riverscape genetics of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) distributed continuously along headwater channel networks. *Molecular Ecology* 20: 3711–3729.
- Keller, I., Taverna, A. y Seehausen, O. 2011. Evidence of neutral and adaptive genetic divergence between european trout populations sampled along altitudinal gradients. *Molecular Ecology* 20: 1888–1904.
- Kenchington, E., Heino, M. y Nielsen, E.E. 2003. Managing marine genetic diversity: time for action? *Ices Journal of Marine Science* 60: 1172–1176.
- Klemetsen, A., Amundsen, P.A., Dempson, J.B., Jonsson, B., Jonsson, N., O’Connell, M.F. y Mortensen, E. 2003. atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish* 12: 1–59.
- Knouft, J. y Spotila, J. 2002. Assessment of movements of resident stream brown trout, *Salmo trutta* L., among contiguous sections of stream. *Ecology of Freshwater Fish* 11: 85–92.
- Kohout, J., Jašková, I., Papoušek, I., Šedivá, A. y Šlechta, V. 2012. Effects of stocking on the genetic structure of brown trout, *Salmo trutta*, in central Europe inferred from mitochondrial and nuclear DNA markers. *Fisheries Management and Ecology* 19: 252–263.
- Kohout, J., Šedivá, A., Apostolou, A., Stefanov, T., Marić, S., Gafurović, M. y Šlechta, V. 2013. Genetic diversity and phylogenetic origin of brown trout *Salmo trutta* populations in eastern Balkans. *Biologia* 68: 1229–1237.
- Koizumi, I., Yamamoto, S. y Maekawa, K. 2006. Decomposed pairwise regression analysis of genetic and geographic distances reveals a metapopulation structure of stream-dwelling dolly varden charr. *Molecular Ecology* 15: 3175–3189.
- Kottelat, M. 1997. european freshwater fishes: an heuristic checklist of the frshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. *Biologia, Bratislava* 52/Supplement 52: 1–271.

- Kottelat, M. y Freyhof, J. 2007. *Handbook of european freshwater fishes*. Cornol: Publications Kottelat, Berlin, 646 pp.
- Krijgsman, W., Hilgen, F., Raffi, I., Sierro, F. y Wilson, D. 1999. Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* 400: 652–655.
- Laikre, L., Järvi, T., Johansson, L., Palm, S., Rubin, J.-F., Glimsäter, C., Landergrén, P. y Ryman, N. 2002. Spatial and temporal population structure of sea trout at the Island of Gotland, Sweden, delineated from mitochondrial DNA. *Journal of Fish Biology* 60: 49–71.
- Laikre, L., Schwartz, M.K., Waples, R.S. y Ryman, N. 2010. Compromising genetic diversity in the wild: unmonitored large-scale release of plants and animals. *Trends in ecology y evolution* 25: 520–529.
- Langella, O. 1999. Populations 1.2.32. http://bioinformatics.org/*tryphon/populations/
- Largiadèr, C. y Scholl, A. 1996. Genetic introgression between native and introduced brown trout *Salmo trutta* L. populations in the Rhone river basin. *Molecular Ecology* 5: 417–426.
- Largiadèr, C.R., Scholl, A. y Largiadèr, C.R. 1995. Effects of stocking on the genetic diversity of brown trout populations of the Adriatic and Danubian drainages in Switzerland. *Journal of Fish Biology* 47: 209–225.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. y Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2947.
- Lavergne, S., Mouquet, N., Thuiller, W. y Ronce, O. 2010. Biodiversity and climate change: integrating evolutionary and ecological responses of species and communities. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 41: 321–350.
- Lee, W.-J., Conroy, J., Howell, W.H. y Kocher, T.D. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution* 41: 54–56.
- Lelek, A. 1987. *The freshwater fishes of Europe, vol. 9*. Aula-Verlag, Wiesbaden. Verlag, Wiesbaden, 343 pp.
- Lerceteau-Köhler, E., Schliwen, U., Kopun, T. y Weiss, S. 2013. Genetic variation in brown trout *Salmo trutta* across the Danube, Rhine, and Elbe headwaters: a failure of the phylogeographic paradigm? *BMC evolutionary biology* 13: 176.
- Leunda, P. 2010. Impacts of non-native fishes on iberian freshwater ichthyofauna: current knowledge and gaps. *Aquatic Invasions* 5: 239–262.
- Levene, H. 1960. Robust test for equality of variances. *Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling* 2: 278–292.
- Levy, A., Doadrio, I. y Almada, V.C. 2009. Historical biogeography of european leuciscins (Cyprinidae): evaluating the Lago Mare dispersal hypothesis. *Journal of Biogeography* 36: 55–65.
- Librado, P. y Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics Applications note* 25: 1451–1452.
- Lindley, S.T., Grimes, C.B., Mohr, M.S., Peterson, W.T., Stein, J.E., Anderson, J.J., Botsford, L.W., Bottom, D.L., Busack, C.A. y Collier, T.K. 2009. *What caused the Sacramento River fall Chinook stock collapse?* Informe inédito. US Department of Commerce,

- National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, Southwest Fisheries Science Center, Fisheries Ecology Division, 57 pp.
- Lopes-Cunha, M., Aboim, M. a., Mesquita, N., Alves, M.J., Doadrio, I. y Coelho, M.M. 2012. Population genetic structure in the iberian cyprinid fish *Iberochondrostoma lemmingii* (Steindachner, 1866): disentangling species fragmentation and colonization processes. *Biological Journal of the Linnean Society* 105: 559–572.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S. y De Poorter, M. 2000. *100 of the World's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database*. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), Auckland, 12 pp.
- Loxterman, J.L. y Keeley, E.R. 2012. Watershed boundaries and geographic isolation: patterns of diversification in cutthroat trout from western North America. *BMC evolutionary biology* 12: 38.
- Luck, G.W., Daily, G.C. y Ehrlich, P.R. 2003. Population diversity and ecosystem services. *Trends in Ecology y Evolution* 18: 331–336.
- Luikart, G., Allendorf, F.W., Cornuet, J.M. y Sherwin, W.B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *The Journal of heredity* 89: 238–247.
- Lynch, M. y O'Hely, M. 2001. Captive breeding and the genetic fitness of natural populations. *Conservation Genetics* 2: 363–378.
- Machordom, A. 2003. *Análisis genéticos de poblaciones de trucha común*. Informe inédito. 30 pp.
- Machordom, A. y Perdices, A. 2001. Conservación Genética de los Peces Continentales Españoles. En: *“Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España”*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid, pp: 287–294.
- Machordom, A., García-Marín, J.L., Sanz, N., Almodóvar, A. y Pla, C. 1999. Allozyme diversity in brown trout (*Salmo trutta*) from Central Spain: Genetic consequences of restocking. *Freshwater Biology* 41: 707–717.
- Machordom, A., Suárez, J., Almodóvar, A. y Bautista, J.M. 2000. Mitochondrial haplotype variation and phylogeography of iberian brown trout populations. *Molecular Ecology* 9: 1325–1338.
- Magallón, S. 2010. Using fossils to break long branches in molecular dating: a comparison of relaxed clocks applied to the origin of angiosperms. *Systematic Biology* 59: 384–399.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research* 27: 209–20.
- Maric, S., Susnik, S., Simonovic, P. y Snoj, A. 2006. Phylogeographic study of brown trout from Serbia, based on mitochondrial DNA control region analysis. *Genetic Selection Evolution* 38: 411–430.
- Marie, A.D., Bernatchez, L. y Garant, D. 2010. Loss of genetic integrity correlates with stocking intensity in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Molecular Ecology* 19: 2025–2037.
- Martínez, P., Arias, J., Castro, J. y Sánchez, L. 1993. Differential stocking incidence in brown trout (*Salmo trutta*) populations from Northwertern Spain. *Aquaculture* 114: 203–216.
- Martínez, P., Bouza, C., Castro, J., Hermida, M., Pardo, B.G. y Sánchez, L. 2007. Analysis of a secondary contact between divergent lineages of brown trout *Salmo trutta* L. from

- Duero basin using microsatellites and mtDNA RFLPs. *Journal of Fish Biology* 71: 195–213.
- Martínez-Martínez, J., Booth-Rea, G., Azañón, J. y Torcal, F. 2006. Active transfer fault zone linking a segmented extensional system (Betics, southern Spain): Insight into heterogeneous extension driven by edge delamination. *Tectonophysics* 422: 159–173.
- Martínez-Solano, I., Teixeira, J., Buckley, D., García-París, M. y García-París, M. 2006. Mitochondrial DNA phylogeography of *Lissotriton boscai* (Caudata, Salamandridae): evidence for old, multiple refugia in an iberian endemic. *Molecular Ecology* 15: 3375–3388.
- McKeown, N.J., Hynes, R.A., Duguid, R.A., Ferguson, A. y Prodohl, P.A. 2010. Phylogeographic structure of brown trout *Salmo trutta* in Britain and Ireland: glacial refugia, postglacial colonization and origins of sympatric populations. *Journal of Fish Biology* 76: 319–347.
- McMeel, O.M., Hoey, E.M. y Ferguson, A. 2001. Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, of the brown trout (*Salmo trutta*) lactate dehydrogenase, *LDH-C1*90* and *100** alleles. *Molecular Ecology* 10: 29–34.
- Meier, K., Hansen, M.M., Bekkevold, D., Skaala, Ø. y Mensberg, K.-L.D. 2011. An assessment of the spatial scale of local adaptation in brown trout (*Salmo trutta* L.): footprints of selection at microsatellite DNA loci. *Heredity* 106: 488–99.
- Meier, K., Hansen, M.M.M., Normandeau, E., Mensberg, K.-L.D., Frydenberg, J., Larsen, P.F., Bekkevold, D., Bernatchez, L. y Foged, P. 2014. Local adaptation at the transcriptome level in brown trout: evidence from early life history temperature genomic reaction norms. *PLoS One* 9: e85171.
- Meldgaard, T., Nielsen, E.E. y Loeschcke, V. 2003. Fragmentation by weirs in a riverine system: A study of genetic variation in time and space among populations of european grayling (*Thymallus thymallus*) in a danish river system. *Conservation Genetics* 4: 735–747.
- Melo-Ferreira, J., Boursot, P., Suchentrunk, F., Ferrand, N. y Alves, P.C. 2005. Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology* 14: 2459–2464.
- Meraner, A., Baric, S., Pelster, B., Via, J.D. y Dalla Via, J. 2007. Trout (*Salmo trutta*) mitochondrial DNA polymorphism in the centre of the marble trout distribution area. *Hydrobiologia* 579: 337–349.
- Meraner, A., Baric, S., Pelster, B. y Dalla Via, J. 2010. Microsatellite DNA data point to extensive but incomplete admixture in a marble and brown trout hybridisation zone. *Conservation Genetics* 11: 985–998.
- Meraner, A., Gratton, P., Baraldi, F. y Gandolfi, A. 2013. Nothing but a trace left? Autochthony and conservation status of northern Adriatic *Salmo trutta* inferred from PCR multiplexing, mtDNA control region sequencing and microsatellite analysis. *Hydrobiologia* 702: 201–213.
- Mesquita, N., Cunha, C., Carvalho, G.R. y Coelho, M.M. 2007. Comparative phylogeography of endemic cyprinids in the south-west iberian Peninsula: evidence for a new ichthyogeographic area. *Journal of Fish Biology* 71: 45–75.
- Metcalf, J.L., Love Stowell, S., Kennedy, C.M., Rogers, K.B., McDonald, D., Epp, J., Keepers, K., Cooper, A., Austin, J.J. y Martin, P. 2012. Historical stocking data and 19th century

- DNA reveal human-induced changes to native diversity and distribution of cutthroat trout. *Molecular Ecology* 21: 5194–5207.
- Miller, K.G., Kominz, M. a, Browning, J. V, Wright, J.D., Mountain, G.S., Katz, M.E., Sugarman, P.J. Cramer, B.S. Christie-Blick, N. y Pekar, S.F. 2005. The Phanerozoic record of global sea-level change. *Science* 310: 1293–1298.
- Milner, N.J., Elliott, J.M., Armstrong, J.D., Gardiner, R., Welton, J.S. y Ladle, M. 2003. The natural control of Salmon and trout populations in streams. *Fisheries Research* 62: 111–125.
- Mittermeier, R.A., Robles-Gil, P., Hoffmann, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C.G., Lamoreux, J. y da Fonseca, G.A.B. 2004. *Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered ecoregions*. CEMEX, Mexico D.F., 392 pp.
- Morán, P. 2002. Current conservation genetics: building an ecological approach to the synthesis of molecular and quantitative genetic methods. *Ecology of Freshwater Fish* 11: 30–55.
- Morán, P.M., Pendás, A., García-Vázquez, E., Izquierdo, J.I. y Lobón-Cerviá, J. 1995. Estimates of gene flow among neighbouring populations of brown trout. *Journal of Fish Biology* 46: 593–602.
- Moritz, C., Dowling, T. y Brown, W. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 269–292.
- Muñoz, M. y Casadevall, M. 1997. Fish remains from Arbreda cave (Serinya, Girona), northeast Spain, and their palaeoecological significance. *Journal of Quaternary Science* 12: 111–115.
- Myers, N., Mittermeier, R. a, Mittermeier, C.G., da Fonseca, G. a y Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283–292.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, 512 pp.
- Nei, M., Maruyama, T. y Chakraborty, R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 1–10.
- Nicola, G.G. y Almodóvar, A. 2002. Reproductive traits of stream-dwelling brown trout *Salmo trutta* in contrasting neighbouring rivers of central Spain. *Freshwater Biology* 47: 1353–1365.
- Nicola, G.G. y Almodóvar, A. 2004. Growth pattern of stream-dwelling brown trout under contrasting thermal conditions. *Transactions of the American Fisheries Society* 133: 66–78.
- Nicola, G.G., Almodóvar, A., Jonsson, B. y Elvira, B. 2008. Recruitment variability of resident brown trout in peripheral populations from southern Europe. *Freshwater Biology* 53: 2364–2374.
- Nicola, G.G., Almodóvar, A. y Elvira, B. 2009. Influence of hydrologic attributes on brown trout recruitment in low-latitude range margins. *Oecologia* 160: 515–524.
- Novo, M., Almodóvar, A. y Díaz-Cosin, D.J. 2009. High genetic divergence of hormogastrid earthworms (*Annelida, Oligochaeta*) in the central iberian Peninsula: evolutionary and demographic implications. *Zoologica Scripta* 38: 537–552.
- O'Reilly, P.T., Hamilton, L.C., McConnell, S.K. y Wright, J.M. 1996. Rapid analysis of genetic variation in atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and

- tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 2292–2298.
- Ojanguren, a F., Reyes-Gavilán, F.G. y Braña, F. 2001. Thermal sensitivity of growth, food intake and activity of juvenile brown trout. *Journal of Thermal biology* 26: 165–170.
- Ontiveros, A., Ramírez, J., López Ontiveros, A. y Naranjo Ramírez, J. 2000. Juan Carandell Pericay (1893-1937) y Sierra Nevada. *Cuadernos geográficos de la Universidad de Granada* 30: 281–324.
- Oosterhout, G.R., Huntington, C.W., Nickelson, T.E. y Lawson, P.W. 2005. Potential benefits of a conservation hatchery program for supplementing Oregon coast coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) populations: a stochastic model investigation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62: 1920–1935.
- Orszag-Sperber, F. 2006. Changing perspectives in the concept of “Lago-Mare” in mediterranean late Miocene evolution. *Sedimentary Geology* 188-189: 259–277.
- Ortiz, J., Torres, T., Llamas, J., Canoira, L., García-Alonso, P., García de la Morena, M. y Lucini, M. 2000. (Sector de Cúllar-Baza, Granada, España) y primera estimación de la edad de la apertura de la cuenca mediante el método de racemización de aminoácidos. *Geogaceta* 28: 109–112.
- Osinov, A. y Bernatchez, L. 1996. atlantic and Danubean phylogenetic groupings of brown trout (*Salmo trutta* L.) complex: genetic divergence, evolution, and conservation. *Journal of Ichthyology* 36: 762–786.
- Østergaard, S., Hansen, M.M., Loeschcke, V. y Nielsen, E.E. 2003. Long-term temporal changes of genetic composition in brown trout (*Salmo trutta* L.) populations inhabiting an unstable environment. *Molecular Ecology* 12: 3123–3135.
- Östergren, J. y Nilsson, J. 2012. Importance of life-history and landscape characteristics for genetic structure and genetic diversity of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Ecology of Freshwater Fish* 21: 119–133.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. y Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347–354.
- Paetkau, D., Slade, R., Burden, M. y Estoup, A. 2004. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13: 55–65.
- Page, R.D. y Holmes, E.C. 2009. *Molecular evolution: a phylogenetic approach*. Blackwell Science Ltd, Oxford, 352 pp.
- Pakkasmaa, S. y Piironen, J. 2001. Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 231–239.
- Palmé, A., Laikre, L. y Ryman, N. 2013. Monitoring reveals two genetically distinct brown trout populations remaining in stable sympatry over 20 years in tiny mountain lakes. *Conservation Genetics* 14: 795–808.
- Palumbi, S.R. y Baker, C.S. 1994. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution* 11: 426–435.
- Parra, I., Almodóvar, A., Nicola, G.G. y Elvira, B. 2009. Latitudinal and altitudinal growth patterns of brown trout *Salmo trutta* at different spatial scales. *Journal of Fish Biology* 74: 2355–2373.

- Parra, I., Nicola, G., Vøllestad, L., Elvira, B. y Almodóvar, A. 2014. Latitude and altitude differentially shape life history trajectories between the sexes in non-anadromous brown trout. *Evolutionary Ecology* 28: 707–720.
- Peakall, R. y Smouse, P.E. 2006. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Perea, S. y Doadrio, I. 2009. Estudio paleosistemático de la ictiofauna de la cueva de Cobrante. Palaeosystematic study of the ichthyofauna from Cueva de Cobrante. *Sautuola: Revista del Instituto de Prehistoria y Arqueología Sautuola* 15: 115–127.
- Perea, S., Böhme, M., Zupancic, P., Freyhof, J., Sanda, R., Özulug, M., Abdoli, A. y Doadrio, I. 2010. Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in circum-mediterranean subfamily *Leuciscinae* (*Teleostei*, *Cyprinidae*) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *BMC Evolutionary Biology* 10: 265.
- Pérez-Alberti, A., Valcárcel, M. y Blanco, R. 2004. Pleistocene glaciation in Spain. En: *Quaternary glaciations—extent and chronology. Part I: Europe*. Ehlers J.E. y Gibbard P.L. (eds.). Elsevier B.V., London, pp: 389–394.
- Pérez-Peña, J., Azor, A., Azañón, J. y Keller, E. 2010. Active tectonics in the Sierra Nevada (Betic cordillera, SE Spain): insights from geomorphic indexes and drainage pattern analysis. *Geomorphology* 119: 74–87.
- Perrier, C., Guyomard, R., Bagliniere, J.-L., Nikolic, N. y Evanno, G. 2013. Changes in the genetic structure of atlantic salmon populations over four decades reveal substantial impacts of stocking and potential resiliency. *Ecology and Evolution* 3: 2334–2349.
- Perrin, C. y Bosellini, F.R. 2012. Paleobiogeography of scleractinian reef corals: Changing patterns during the Oligocene – Miocene climatic transition in the Mediterranean. *Earth-Science Reviews* 111: 1–24.
- Phillips, R.B.R.B., Sajdak, S.L.S.L. y Domanico, M.J.M.J. 1995. Relationships among charrs based on DNA sequences. *Nordic Journal of Freshwater Research* 71: 378–391.
- Phillips, R.B., Matsuoka, M.P., Konon, I., Reed, K.M. y McEachran, M. 2000. Phylogenetic analysis of mitochondrial and nuclear sequences supports inclusion of *Acantholingua ohridana* in the genus *Salmo*. *Copeia* 2000: 546–550.
- Piry, S., Alapetite, a, Cornuet, J.-M., Paetkau, D., Baudouin, L. y Estoup, a. 2004. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *The Journal of heredity* 95: 536–539.
- Planelles-Gomis, M. 1999. *Peces Ciprinodóntidos Ibéricos. Fartet y Samaruc*. Monografías, Consellería de Medio Ambiente, Generalitat Valenciana, 357 pp.
- Pleyte, K., Duncan, S. y Phillips, R. 1992. Evolutionary relationships of the *Salmonid* fish genus *Salvelinus* inferred from DNA sequences of the first internal transcribed spacer (ITS 1) of ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 223–230.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E. y Taberlet, P. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews. Genetics* 6: 847–859.
- Posada, D. y Crandall, K. a. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13757–13762.
- Poteaux, C., Bonhomme, F. y Berrebi, P. 1998. Differences between nuclear and mitochondrial introgressions of brown trout populations from a restocked main river and its unstocked tributary. *Biological Journal of the Linnean Society* 63: 379–392.

- Poteaux, C., Bonhomme, F. y Berrebi, P. 1999. Microsatellite polymorphism and genetic impact of restocking in mediterranean brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity* 82: 645–653.
- Poteaux, C., Berrebi, P. y Bonhomme, F. 2001. Allozymes, mtDNA and microsatellites study introgression in a stocked trout population in France. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 281–292.
- Presa, P., Pardo, B.G., Martínez, P. y Bernatchez, L. 2002. Phylogeographic congruence between mtDNA and rDNA ITS markers in brown trout. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2161–2175.
- Pritchard, J., Stephens, M. y Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Pritchard, J., Wen, W. y Falush, D. 2010. Documentation for Structure software: version 2.3. <http://pritch.bsd.uchicago.edu/stru>.
- Pujolar, J., Lucarda, A., Simonato, M. y Patarnello, T. 2011. Restricted gene flow at the micro- and macro-geographical scale in marble trout based on mtDNA and microsatellite polymorphism. *Frontiers in Zoology* 8: 7.
- Pustovrh, G., Snoj, A. y Bajec, S.S. 2014. Molecular phylogeny of *Salmo* of the western Balkans, based upon multiple nuclear loci. *Genetics, Selection, Evolution* 46: 7.
- Querci, G., Pecchioli, E., Leonzio, C., Frati, F. y Nardi, F. 2012. Molecular characterization and hybridization in *Salmo* (*trutta*) *macrostigma* morphotypes from Central Italy. *Hydrobiologia* 702: 191–200.
- Rahel, F.J. 2007. Biogeographic barriers, connectivity and homogenization of freshwater faunas: it's a small world after all. *Freshwater Biology* 52: 696–710.
- Rahel, F.J. 2013. Intentional fragmentation as a management strategy in aquatic systems. *BioScience* 63: 362–372.
- Rambaut, A. 2008. FigTree v1.2. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software>.
- Rambaut, a y Bromham, L. 1998. Estimating divergence dates from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 15: 442–448.
- Rambaut, A. y Drummond, A.J. 2007. Tracer v1.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Ramey, R., Luikart, G. y Singer, F. 2000. Genetic bottlenecks resulting from restoration efforts: the case of bighorn sheep in Badlands National Park. *Restoration Ecology* 8: 85–90.
- Ramírez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., Calafell, F. y Navarro, A. 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics* 179: 555–567.
- Rannala, B. y Yang, Z. 2007. Inferring speciation times under an episodic molecular clock. *Systematic Biology* 56: 453–466.
- Ray, N., Currat, M. y Excoffier, L. 2003. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution* 20: 76–86.
- Razpet, A., Susnik, S., Jug, T. y Snoj, A. 2007. Genetic variation among trout in the river Neretva basin, Bosnia and Herzegovina. *Journal of Fish Biology* 70: 94–110.
- Reed, D.H. y Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17: 230–237.
- Reusch, T.B.H., Ehlers, A., Hämmerli, A. y Worm, B. 2005. Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 2826–2831.

- Reyjol, Y., Hugueny, B., Pont, D., Bianco, P.G., Beier, U., Caiola, N., Casals, F., Cowx, I., Economou, A., Ferreira, T., Haidvogel, G., Noble, R., de Sostoa, A., Vigneron, T. y Virbickas, T. 2007. Patterns in species richness and endemism of european freshwater fish. *Global Ecology and Biogeography* 16: 65–75.
- Reynaud, N., Tougaard, C. y Berrebi, P. 2011. Structuration géographique de la truite commune (*Salmo trutta* L.) en France basée sur le séquençage de la région de contrôle mitochondriale. Informe inédito. Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier, UMR CNRS/UM2/IRD 554, Equipe Evolution des Poissons, Montpellier, 46 pp.
- Rhymer, J.M. y Simberloff, D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 83–109.
- Ribeiro, F., Collares-Pereira, M.J. y Moyle, P.B. 2009. Non-native fish in the fresh waters of Portugal, Azores and Madeira islands: a growing threat to aquatic biodiversity. *Fisheries Management and Ecology* 16: 255–264.
- Ribeiro, F. y Leunda, P.M. 2012. Non-native fish impacts on mediterranean freshwater ecosystems: current knowledge and research needs. *Fisheries Management and Ecology* 19: 142–156.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution* 43: 223–225.
- Robalo, J.I., Almada, V.C., Levy, A. y Doadrio, I. 2007. Re-examination and phylogeny of the genus *Chondrostoma* based on mitochondrial and nuclear data and the definition of 5 new genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 362–372.
- Robinson-Rechavi, M. y Huchon, D. 2000. RRTree: relative-rate tests between groups of sequences on a phylogenetic tree. *Bioinformatics Applications note* 16: 296–297.
- Rodríguez-Fernández, J. 1982. El Mioceno del sector central de las cordilleras béticas. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 216 pp.
- Rodríguez-Vidal, J. y Gracia-Prieto, F. 2004. Evolución geomorfológica del Sur de Iberia durante el Neógeno y el Cuaternario. En: *En zona arqueológica, 4, miscelánea en homenaje a Emiliano Aguirre, vol. I (Geología)*. Pérez, E. y Jara, S. (eds.). Museo Arqueológico Regional, Alcalá de Henares, pp: 124–133.
- Rogers, A.R. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* 49: 608–615.
- Rogers, A.R. 1997. Population structure and modern human origins. *IMA Volumes in mathematics and its applications* 87: 55–79.
- Rogers, A.R. y Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552–569.
- Rögl, F. 1999. Mediterranean and Paratethys. Facts and hypotheses of an Oligocene to Miocene paleogeography (short overview). *Geologica carpathica* 50: 339–349.
- Rolland, J., Cadotte, M.W., Davies, J., Devictor, V., Lavergne, S., Mouquet, N., Pavoine, S., Rodrigues, A., Thuiller, W., Turcati, L., Winter, M., Zupan, L., Jabot, F. y Morlon, H. 2012. Using phylogenies in conservation: new perspectives. *Biology Letters* 8: 692–694.
- Ronquist, F. y Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Rosenbaum, G. y Lister, G. 2004a. Formation of arcuate orogenic belts in the western mediterranean region. *Geological Society of America Special Paper* 383: 41–56.
- Rosenbaum, G. y Lister, G. 2004b. Neogene and Quaternary rollback evolution of the Tyrrhenian Sea, the Apennines, and the Sicilian Maghrebides. *Tectonics* 23: 1–17.

- Rosenbaum, G., Lister, G. y Duboz, C. 2002. Reconstruction of the tectonic evolution of the western Mediterranean since the Oligocene. *Journal of the Virtual Explorer* 8: 107–130.
- Rousset, F. 2008. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103–106.
- Ruano, P., Galindo-Zaldívar, J. y Jabaloy, A. 2000. Evolución geológica desde el Mioceno del sector noroccidental de la depresión de Granada (cordilleras Béticas). *Revista Sociedad Geológica de España* 13: 143–155.
- Ruiz-Bustos, A., Fernández, J., Morales, J., Rodríguez-Fernández, J. y Vera, J. 1990. Biostratigrafía de los materiales plio-cuaternarios del borde norte de la depresión de Granada. *Estudios geológicos* 46: 277–290.
- Rundel, P. 1998. Landscape disturbance in mediterranean-type ecosystems: an overview. In: *Landscape disturbance and biodiversity in mediterranean-type ecosystems*, pp. 3–22.
- Rutschmann, F. 2006. Molecular dating of phylogenetic trees: A brief review of current methods that estimate divergence times. *Diversity and Distributions* 12: 35–48.
- Ruzzante, D.E., Hansen, M.M. y Meldrup, D. 2001. Distribution of individual inbreeding coefficients, relatedness and influence of stocking on native anadromous brown trout (*Salmo trutta*) population structure. *Molecular Ecology* 10: 2107–2128.
- Ruzzante, D.E., Hansen, M.M., Meldrup, D. y Ebert, K.M. 2004. Stocking impact and migration pattern in an anadromous brown trout (*Salmo trutta*) complex: where have all the stocked spawning sea trout gone? *Molecular Ecology* 13: 1433–1445.
- Ryder, O. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *TRENDS in Ecology and Evolution* 1: 9–10.
- Ryman, N. 1983. Patterns of distribution of biochemical genetic variation in *Salmonids*: differences between species. *Aquaculture* 33: 1–21.
- Ryman, N. y Laikre, L. 1991. Effects of supportive breeding on the genetically effective population size. *Conservation Biology* 5: 325–329.
- Sáez, P. 2010. Análisis de la distribución histórica de la trucha común (*Salmo trutta*, Linnaeus, 1758) en Andalucía. *Ríos con Vida* 85: 16–19.
- Sáez, P., Menor, A., Galindo, J., Larios, J.E., Rubio, S. y Preda, J. 2010. El estudio de las distribuciones históricas aplicado a la recuperación de especies: el caso de la Trucha Común (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) en Andalucía. Póster. XV Congreso de la Asociación Ibérica de Limnología. Punta Delgada, Azores.
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
- Salzburger, W., Brandstatter, A., Gilles, A., Parson, W., Hempel, M., Sturmhuber, C. y Meyer, A. 2003. Phylogeography of the vairone (*Leuciscus souffia*, Risso 1826) in Central Europe. *Molecular Ecology* 12: 2371–2386.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1659 pp.
- Sanderson, M.J. 1996. A nonparametric approach of rate constancy to estimating divergence times in the absence. *Molecular Biology and Evolution* 14: 1218–1231.
- Sanjurjo, O.I., Carmona, J.A. y Doadrio, I. 2003. Evolutionary and biogeographical patterns within iberian populations of the genus *Squalius* inferred from molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 20–30.

- Sanz, N., García-Marín, J.L. y Pla, C. 2000. Divergence of brown trout (*Salmo trutta*) within glacial refugia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57: 2201–2210.
- Sanz, N., García-Marín, J.L. y Pla, C. 2002. Managing fish populations under mosaic relationships. The case of brown trout (*Salmo trutta*) in peripheral mediterranean populations. *Conservations Genetics* 3: 385–400.
- Sanz, N., Cortey, M., Pla, C. y García-Marín, J.L. 2006. Hatchery introgression blurs ancient hybridization between brown trout (*Salmo trutta*) lineages as indicated by complementary allozymes and mtDNA markers. *Biological Conservation* 130: 278–289.
- Sanz, N., Araguas, R.M., Fernández, R., Vera, M. y García-Marín, J.-L. 2009. Efficiency of markers and methods for detecting hybrids and introgression in stocked populations. *Conservation Genetics* 10: 225–236.
- Sanz, N., Fernández-Cebrián, R., Casals, F., Araguas, R.M. y García-Marín, J.L. 2011. Dispersal and demography of brown trout, *Salmo trutta*, inferred from population and family structure in unstable mediterranean streams. *Hydrobiologia* 671: 105–119.
- Schenekar, T., Lerceteau-Köhler, E. y Weiss, S. 2014. Fine-scale phylogeographic contact zone in Austrian brown trout *Salmo trutta* reveals multiple waves of post-glacial colonization and a pre-dominance of natural versus anthropogenic admixture. *Conservation Genetics* 15: 561–572.
- Schettino, A. y Turco, E. 2006. Plate kinematics of the western mediterranean region during the Oligocene and early Miocene. *Geophysical Journal International* 166: 1398–1423.
- Schindler, D.E., Hilborn, R., Chasco, B., Boatright, C.P., Quinn, T.P., Rogers, L.A. y Webster, M.S. 2010. Population diversity and the portfolio effect in an exploited species. *Nature* 465: 609–612.
- Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers--just a matter of fashion? *Nature Reviews. Genetics* 5: 63–69.
- Schluter, D. 2000. *The ecology of adaptive radiation*. Oxford University Press, Oxford, 300 pp.
- Schneider, S. y Excoffier, L. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079–1089.
- Schöffmann, J., Susnik, S. y Snoj, A. 2007. Phylogenetic origin of *Salmo trutta* L 1758 from Sicily, based on mitochondrial and nuclear DNA analyses. *Hydrobiologia* 575: 51–55.
- Scribner, K., Page, K. y Bartron, M. 2001. Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 293–323.
- Shapiro, S.S., Wilk, M.B. y Chen, H.J. 1968. A comparative study of various tests of normality. *Journal of the American Statistical Association* 63: 1343–1372.
- Shapiro, M.D., Bell, M. a y Kingsley, D.M. 2006. Parallel genetic origins of pelvic reduction in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 13753–13758.
- Shedlock, A.M., Parker, J.D., Crispin, D.A., Pietsch, T.W. y Burner, G.C. 1992. Evolution of the *Salmonid* mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 179–192.

- Skaala, Ø., Jørstad, K.E. y Borgstrøm, R. 1996. Genetic impact on two wild brown trout (*Salmo trutta*) populations after release of non-indigenous hatchery spawners. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 2027–2035.
- Skibinski, D.O.F. y Ward, R.D. 1998. Are polymorphism and evolutionary rate of allozyme proteins limited by mutation or selection? *Heredity* 81: 692–702.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264–279.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457–462.
- Slatkin, M. y Hudson, R.R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555–562.
- Slettan, A., Olsaker, I. y Lie, O. 1995. atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci. *Animal Genetics* 26: 281–282.
- Slettan, A., Olsaker, I. y Lie, O. 1996. Polymorphic atlantic Salmon, *Salmo salar* L, microsatellites at the SSOSL438, SSOSL439 and SSOSL444 loci. *Animal Genetics* 27: 87–88.
- Smith, G.R. 1992. Introgression in fishes: significance for paleontology, cladistics, and evolutionary rates. *Systematic Biology* 41: 41–57.
- Smith, K.G. y Darwall, W.R.T. 2006. *The status and distribution of freshwater fish endemic to the mediterranean basin*. IUCN, Gland and Cambridge, 34 pp.
- Snoj, A., Bogut, I. y Susnik, S. 2008. Evidence of a genetically distinct population of Vrljika softmouth trout *Salmo obtusirostris* Heckel evolved by vicariance. *Journal of Fish Biology* 72: 1945–1959.
- Snoj, A., Maric, S., Berrebi, P., Crivelli, A.J., Shumka, S., Susnik, S. y Marić, S. 2009. Genetic architecture of trout from Albania as revealed by mtDNA control region variation. *Genetics Selection Evolution* 41: 22.
- Snoj, A., Marić, S., Bajec, S.S., Berrebi, P., Janjani, S. y Schöffmann, J. 2011. Phylogeographic structure and demographic patterns of brown trout in North-West Africa. *Molecular phylogenetics and evolution* 61: 203–11.
- Sønstebo, J.H. 2007. Population genetics of alpine brown trout (*Salmo trutta* L.): implications for conservation and management. Tesis Doctoral, Norwegian University of Life Sciences, Oslo, 126 pp.
- Sønstebo, J.H., Borgstrøm, R. y Heun, M. 2007. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. *Conservation Genetics* 8: 33–44.
- Sønstebo, J.H., Borgstrøm, R. y Heun, M. 2008a. High genetic introgression in alpine brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from Hardangervidda, Norway. *Ecology of Freshwater Fish* 17: 174–183.
- Sønstebo, J.H., Borgstrøm, R. y Heun, M. 2008b. Genetic structure in alpine brown trout *Salmo trutta* L. shows that indirect stocking affects native lake populations. *Journal of Fish Biology* 72: 1990–2001.
- Sousa-Santos, C., Robalo, J.I., Collares-Pereira, M.J. y Almada, V.C. 2005. Heterozygous indels as useful tools in the reconstruction of DNA sequences and in the assessment of ploidy level and genomic constitution of hybrid organisms. *DNA Sequence* 16: 462–467.

- Sousa, V., Penha, F., Collares-Pereira, M.J., Chikhi, L. y Coelho, M.M. 2008. Genetic structure and signature of population decrease in the critically endangered freshwater cyprinid *Chondrostoma lusitanicum*. *Conservation Genetics* 9: 791–805.
- Sousa-Santos, C., Gante, H., Robalo, J., Cunha, J., Martins, A., Arruda, M., Alves, M.J. y Almada, V. 2014. Evolutionary history and population genetics of a cyprinid fish (*Iberochondrostoma olisiponensis*) endangered by introgression from a more abundant relative. *Conservation Genetics* 15: 665–677.
- Spjøtvoll, E. y Stoline, M. 1973. An extension of the T-method of multiple comparison to include the cases with unequal sample sizes. *Journal of the American Statistical Association* 68: 975–978.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HP: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- StatSoft, I. 2002. STATISTICA for Windows. StatSoft, Inc., Tulsa. <http://www.statsoft.com>.
- Stearley, R.F. y Smith, G.R. 1993. Phylogeny of the Pacific trouts and Salmon (*Oncorhynchus*) and genera of the family *Salmonidae*. *Transactions of the American Fisheries Society* 122: 1–33.
- Stelkens, R.B., Jaffuel, G., Escher, M. y Wedekind, C. 2012. Genetic and phenotypic population divergence on a microgeographic scale in brown trout. *Molecular Ecology* 21: 2896–2915.
- Suárez, J., Bautista, J.M., Almodóvar, A. y Machordom, A. 2001. Evolution of the mitochondrial control region in Palaearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. *Heredity* 87: 198–206.
- Sullivan, J. y Joyce, P. 2005. Model Selection in Phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 445–466.
- Sundström, L.F. y Johnsson, J.I. 2001. Experience and social environment influence the ability of young brown trout to forage on live novel prey. *Animal Behaviour* 61: 249–255.
- Susnik, S., Snoj, A., Pohar, J. y Dove, P. 1997. The microsatellite marker (BFRO 002) characteristic for different geographically remote brown trout, *Salmo trutta* L., populations. *Animal Genetics* 28: 370–383.
- Susnik, S., Schoffmann, J. y Snoj, A. 2004. Phylogenetic position of *Salmo* (*PlatySalmo*) platycephalus Behnke 1968 from south-central Turkey, evidenced by genetic data. *Journal of Fish Biology* 64: 947–960.
- Susnik, S., Knizhin, I., Snoj, A., Weiss, S. y Sušnik, S. 2006. Genetic and morphological characterization of a Lake Ohrid endemic, *Salmo* (*Acantholingua*) *ohridanus* with a comparison to sympatric *Salmo trutta*. *Journal of Fish Biology* 68: 2–23.
- Susnik, S., Snoj, A., Wilson, I.F., Mrdak, D. y Weiss, S. 2007. Historical demography of brown trout (*Salmo trutta*) in the Adriatic drainage including the putative *S. letnica* endemic to Lake Ohrid. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 63–76.
- Swofford, D. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts. <http://www.sinauer.com/>.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. y Cosson, J. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453–464.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.

- Tajima, F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. En: *Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology*. Takahata, N. y Clark, A.G. (eds.). Sinauer Associates Inc, Sunderland, pp: 37–59.
- Tamura, K. y Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512–526.
- Takezaki, N. y Nei, M. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144: 389–399.
- Takezaki, N. y Nei, M. 2008. Empirical tests of the reliability of phylogenetic trees constructed with microsatellite DNA. *Genetics* 178: 385–392.
- Taylor, E. 1991. A review of local adaptation in *Salmonid*, with particular reference to Pacific and atlantic salmon. *Aquaculture* 185–207.
- Taylor, E.B., Stamford, M.D. y Baxter, J.S. 2003. Population subdivision in westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) at the northern periphery of its range: evolutionary inferences and conservation implications. *Molecular Ecology* 12: 2609–2622.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A. y Sing, C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619–633.
- Templeton, A.R. y Sing, C.F. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from the restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 53: 563–590.
- Tougaard, C., Renvoisé, E., Petitjean, A. y Quéré, J.-P. 2008. New insight into the colonization processes of common voles: inferences from molecular and fossil evidence. *PloS One* 3: e3532.
- Tsigenopoulos, C.S., Kotlik, P. y Berrebi, P. 2002. Biogeography and pattern of gene flow among *Barbus* species (*Teleostei: Cyprinidae*) inhabiting the Italian Peninsula and neighbouring Adriatic drainages as revealed by allozyme and mitochondrial sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society* 75: 83–99.
- Valdés, A., Slatkin, M. y Freimer, N. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133: 737–749.
- Van Houdt, J.K.J., Pinceel, J., Flamand, M.-C.-C., Briquet, M., Dupont, E., Volckaert, F. a. M., Baret, P.V. y Van Houdt, J.K.J. 2005. Migration barriers protect indigenous brown trout (*Salmo trutta*) populations from introgression with hatchery fish. *Conservation Genetics* 6: 175–191.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. y Shipley, P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.
- Vera, J. 1994. Geología de Andalucía. *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra* 2: 306–317.
- Vera, J. 2000. El Terciario de la Cordillera Bética: estado actual de conocimientos. *Revista de la Sociedad Geológica de España* 13: 345–373.
- Vera, M. 2006. Estudio de las variaciones espaciales y temporales de la diversidad genética de la trucha común, *Salmo trutta*, en ríos de la Península Ibérica. Tesis Doctoral, Universitat de Girona, 196 pp.

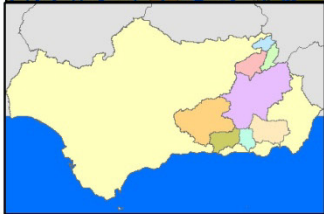
- Vera, M., Cortey, M., Sanz, N. y García-Marin, J.L. 2010a. Maintenance of an endemic lineage of brown trout (*Salmo trutta*) within the Duero river basin. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 48: 181–187.
- Vera, M., Sanz, N., Hansen, M.M., Almodóvar, A. y García-Marin, J.L. 2010b. Population and family structure of brown trout, *Salmo trutta*, in a mediterranean stream. *Marine and Freshwater Research* 61: 672–681.
- Vera, M., Sourinejad, I. y Bouza, C. 2011. Phylogeography , genetic structure , and conservation of the endangered Caspian brown trout , *Salmo trutta caspius* (Kessler , 1877), from Iran. *Hydrobiologia* 664: 51–67.
- Vera, M., García-Marin, J.L., Martínez, P., Araguas, R.M. y Bouza, C. 2013. Identification and conservation of remnant genetic resources of brown trout in relict populations from western mediterranean streams. *Hydrobiologia* 707: 29–45.
- Via, S. 2002. The ecological genetics of speciation. *The American naturalist* 159 (Supplement 3): S1–S7.
- Vidal, O. y Marín, J.G. 2011. Ecological genetics of freshwater fish: a short review of the genotype–phenotype connection. *Animal Biodiversity and Conservation* 2: 309–317.
- Vilas, R., Bouza, C., Castro, J., Lopez, A. y Martínez, P. 2010. Management units of brown trout from Galicia (NW: Spain) based on spatial genetic structure analysis. *Conservation Genetics* 11: 897–906.
- Villegas Molina, F. 1971. El valle de Lecrín. *Cuadernos geográficos de la Universidad de Granada* 5–36. Departamento de Análisis Geográfico Regional y Geografía Física.
- Volckaert, F.A.M., Hänfling, B., Hanfling, B., Hellemans, B. y Carvalho, G.R. 2002. Timing of the population dynamics of bullhead *Cottus gobio* (Teleostei: Cottidae) during the Pleistocene. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 930–944.
- Waples, R. 1991. Pacific Salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of “ species ” under the Endangered Species Act. *Marine Fisheries Review* 53: 11–22.
- Waples, R.S. 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci*. *Conservation Genetics* 7: 167–184.
- Waples, R.S. y Do, C. 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8: 753–756.
- Ward, R.D., Woodward, M. y Skibinski, D. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology* 44: 213–232.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C. y Foresti, F. 2003. Nondestructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138: 161–165.
- Waters, J., Craw, D., Youngson, J. y Wallis, G. 2001. Genes meet geology: fish phylogeographic pattern reflects ancient, rather than modern, drainage connections. *Evolution* 55: 1844–1851.
- Waters, J.M., Allibone, R.M. y Wallis, G.P. 2006. Geological subsidence, river capture, and cladogenesis of galaxiid fish lineages in central New Zealand. *Biological Journal of the Linnean Society* 88: 367–376.
- Watterson, G.A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* 7: 256–276.
- Watterson, A. y Guess, H.A. 1977. Is the most frequent allele the oldest? *Theoretical Population Biology* 11: 141–160.

- Watterson, G.A. 1984. Allele frequencies after a bottleneck. *Theoretical Population Biology* 26: 387–407.
- Webb, J., Verspoor, E., Aubin-Horth, N., Romakkaniemi, A. y Amiro, P. 2007. The atlantic salmon. En: *The atlantic salmon: Genetics, conservation and management*. Verspoor, E., Stradmeyer, L. y Nielsen, J.L. (eds.). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp: 17-56.
- Weir, B.S. y Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- Weiss, S., Antunes, A., Scholötterer, C. y Alexandrino, P. 2000. Mitochondrial haplotype diversity among Portuguese brown trout *Salmo trutta* L. populations: relevance to the post-Pleistocene recolonization of northern Europe. *Molecular Ecology* 9: 691–698.
- Weiss, S., Scholötterer, C., Waidbacher, H. y Jungwirth, M. 2001. Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the austrian Danube: massive introgression of atlantic basin fish by man or nature? *Molecular Ecology* 10: 1241–1246.
- Willett, S.D., McCoy, S.W., Perron, J.T., Goren, L. y Chen, C.-Y. 2014. Dynamic reorganization of river basins. *Science* 343: 1248765.
- Wofford, J., Gresswell, R. y Banks, M. 2005. Influence of barriers to movement on within-watershed genetic variation of coastal cutthroat trout. *Ecological Applications* 15: 628–637.
- Wolf, D., Takebayashi, N. y Rieseberg, L. 2001. Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology* 15: 1039–1053.
- Xia, X. y Xie, Z. 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371–373.
- Xia, X., Xie, Z. y Kjer, K.M. 2003. 18S Ribosomal RNA and Tetrapod Phylogeny. *Systematic Biology* 52: 283–295.
- Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L. y Wang, Y. 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 1–7.
- Yang, Z. y Yoder, A.D. 2003. Comparison of likelihood and bayesian methods for estimating divergence times using multiple gene loci and calibration points, with application to a radiation of cute-looking mouse lemur species. *Systematic Biology* 52: 705–716.
- Yu, Y., Harris, a J. y He, X. 2010. S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): A tool for inferring biogeographic histories. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 848–850.
- Yu, Y., Harris, A. y He, X. 2014. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies) 2.1b. <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/RASP>.
- Yue, G.H. y Orban, L. 2001. Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction. *Marine Biotechnology* 3: 199–204.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E. y Billups, K. 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* 292: 686–693.
- Zardoya, R. y Doadrio, I. 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of european cyprinids. *Journal of Molecular Evolution* 49: 227–237.
- Zardoya, R. y Doadrio, I. 1998. Phylogenetic relationships of iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 265: 1365–1372.

VIII. Bibliografia

Zink, R.M. y Blackwell-Rago, R.C. 2000. Species limits and recent population history in the curve-billed thrasher. *The Condor* 102: 881–886.

Zuckerkandl, E. y Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology* 8: 357–366.



Anexo I (continuación). Localidades estudiadas, año de muestreo, coordenadas geográficas UTM y número de ejemplares capturados (N) de Trucha Común en la cuenca del Guadalquivir.

Subcuenca	Río	Zona de muestreo	Código	Año	UTM X	UTM Y	N
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	Pte. Las Herreras	GU1	2005	505472	4194797	11
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	Pte. PK. 5	GU2	2005	506264	4199085	13
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	Pte. del Hacha	GU3	2005	508176	4202882	2
Alto Guadalquivir	Borosa	Aguas arriba del Ayo. Valdeazores	BO1	2005	515707	4200703	11
Alto Guadalquivir	Borosa	Alto Borosa	BO2	2005	516253	4204479	30
Alto Guadalquivir	Borosa	Coto Borosa	BO3	2005	513216	4206294	22
Alto Guadalquivir	Borosa	Ayo. de las Truchas	BO4	2005	512582	4206092	10
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	Cabecera	AG1	2009	520444	4210027	30
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	Aguas arriba dique	AG2	2005	517738	4211571	30
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	Aguas arriba piscifactoría	AG3	2005	516100	4211777	30
Alto Guadalquivir	Guadalquivir II	Coto Pte. Ortega	GU4	2005	511042	4226792	30
Alto Guadalquivir	Guadalquivir II	Coto Sillero	GU5	2005	497953	4216424	23
Alto Guadalquivir	Aguascebas	Cabecera	AC1	2009	509579	4217104	7
Alto Guadalquivir	Aguascebas	Aguascebas	AC2	2005	503674	4215805	27
G. Menor	Guardal	Aguas abajo piscifactoría	GR1	2005	529003	4193417	25
G. Menor	Castril	Pte. Pino Hermoso	CS1	2005	521309	4191973	30
G. Menor	Castril	Pte. Lezar	CS2	2005	519990	4189089	30
G. Menor	Guadalentín	Vado Carretas	GD1	2005	510458	4191425	31
G. Menor	Guadalentín	Coto Guadalentín	GD2	2005	508782	4188639	30
G. Menor	Guadalentín	Aguas arriba dique Ayo. Tornillos de Gualay	GD3	2005	506344	4191148	29
G. Menor	Guadalentín	Ayo. Tornillos de Gualay	GD4	2005	506476	4191252	30
G. Menor	Ayo. del Pueblo	Ayo. del Pueblo	PU1	2005	488174	4109600	9
G. Menor	Alhorí	Tramo 2	AH1	2009	480930	4110052	2
G. Menor	Alhorí	Tramo 1	AH2	2009	481333	4110315	15
G. Menor	Alhorí	Ayo. de Jerez	AH3	2005	482393	4111666	18
G. Menor	Fardes	El Molinillo	FA1	2005	462278	4129140	30
G. Menor	Fardes	Fca. Sto. Cristo de la Fé	FA2	2005	471429	4128042	30
Guadalimar	Guadalimar	Cortijo Los Llanos	GL1	2005	533769	4250895	5
Genil	Genil	Tramo 2	GE1	2009	471278	4105197	14
Genil	Genil	Tramo 1	GE2	2009	471259	4105281	17
Genil	Genil	Cortijo del Contadero	GE3	2005	465213	4110044	28
Genil	Genil	Estación de Maitena	GE4	2005	463267	4111402	29
Genil	Maitena	Cabecera	MA1	2009	476003	4111195	35
Genil	Maitena	Minicentral Maitena	MA2	2005	466966	4113015	30
Genil	Maitena	Pte. sobre Maitena	MA3	2005	464648	4112846	30
Genil	Aguas Blancas	Cabecera	AB1	2009	460247	4117068	29
Genil	Monachil	Monachil	MO1	2005	453383	4109284	30
Genil	Dílar	Cortijo Las Islas	DI1	2005	450580	4102253	30
Genil	Cacín	Tramo 0	CA1	2009	422600	4082531	32
Genil	Cacín	Venta Vicario	CA2	2005	423207	4083473	14
Genil	Cacín	Tramo 1	CA3	2009	423213	4086423	34
Genil	Cacín	Tramo 2	CA4	2009	423431	4087390	1
Genil	Cacín	Tramo 3	CA5	2009	423457	4087476	8
Genil	Cacín	Tramo 4	CA6	2009	423357	4087640	1
Genil	Cacín	Tramo 5	CA7	2009	423443	4087702	1
Genil	Cacín	La Resinera	CA8	2005	423419	4088803	28
Genil	Cacín	Río Cebollón	CA9	2005	425654	4086000	24
Genil	Cacín	Tramo 7	CA10	2009	423061	4089428	31
Genil	Cacín	Río Añales	CA11	2005	421390	4087343	19
Genil	Cacín	Coto Cacín	CA12	2005	418629	4098319	23
Genil	Alhama	Alhama	AL1	2005	414497	4088174	30

Anexo I (continuación). Localidades estudiadas, año de muestreo, coordenadas geográficas UTM y número de ejemplares capturados (N) de Trucha Común en las cuencas del Guadalfeo, Adra, Andarax y Segura.

Cuenca	Río	Zona de muestreo	Código	Año	UTM X	UTM Y	N
Guadalfeo	Grande de Bérchules	Chico de Bérchules	CB1	2005	482063	4099319	30
Guadalfeo	Grande de Bérchules	Grande de Bérchules	GB1	2005	483655	4100037	14
Guadalfeo	Grande de Bérchules	Aguas abajo confluencia	GB2	2005	483495	4093098	29
Guadalfeo	Trevélez	Cabecera	TR1	2009	478443	4102297	30
Guadalfeo	Trevélez	Refugio Trévelez	TR2	2005	477880	4098021	30
Guadalfeo	Trevélez	Aguas arriba Trévelez	TR3	2005	477087	4095922	30
Guadalfeo	Trevélez	Aguas abajo Trévelez	TR4	2005	476576	4094821	30
Guadalfeo	Poqueira	Cabecera	PO1	2009	470210	4096470	35
Guadalfeo	Poqueira	Central eléctrica	PO2	2005	469019	4094252	31
Guadalfeo	Poqueira	Aguas arriba Capileira	PO3	2005	467801	4089365	30
Guadalfeo	Chico de Soportújar	Cabecera	CH1	2009	463910	4092790	30
Guadalfeo	Chico de Soportújar	Chico de Soportújar	CH2	2005	463714	4091659	30
Guadalfeo	Lanjarón	Cabecera	LA1	2009	459580	4092550	29
Guadalfeo	Lanjarón	Cortijo de la Encina	LA2	2005	459109	4090277	30
Guadalfeo	Torrente	Cabecera	TO1	2009	457518	4095696	35
Guadalfeo	Torrente	Torrente	TO2	2005	454389	4093924	19
Adra	Paterna	Cabecera	PA1	2009	504400	4102962	9
Adra	Paterna	Paterna	PA2	2005	504939	4098625	6
Adra	Bayárcal	Tramo 2	BA1	2009	498073	4105756	18
Adra	Bayárcal	Tramo 1	BA2	2009	497942	4105176	13
Adra	Bayárcal	Cabecera	BA3	2005	498322	4103678	30
Adra	Bayárcal	Bayárcal	BA4	2005	499895	4099597	30
Adra	Mecina	Cabecera	ME1	2009	487842	4102716	30
Adra	Mecina	Mecina	ME2	2005	486766	4093922	21
Andarax	Andarax	Refugio Andarax	AN1	2005	509714	4099315	4
Andarax	Andarax	Ayo. Aguadero	AN2	2005	509592	4099186	30
Andarax	Andarax	Coto I	AN3	2005	509710	4097435	30
Andarax	Andarax	Coto II	AN4	2005	509986	4097013	23
Segura	Segura	Aguas abajo Pontón Bajo	SE1	2005	530000	4220542	30
Segura	Segura	Cabecera	SE2	2005	538009	4224893	30
Segura	Segura	Aguas arriba La Toba	SE3	2005	538569	4225846	30
Segura	Segura	Aguas abajo Anchuricas	SE4	2005	544057	4231363	4
Segura	Madera	Cabecera Refugio	MD1	2005	533716	4234806	21
Segura	Madera	Bar El Pescador	MD2	2005	533475	4228241	25
Segura	Madera	Cortijo Arrancapechos	MD3	2005	534441	4226710	15
Segura	Zumeta	Tobos	ZU1	2005	545718	4223208	30
Segura	Zumeta	Cortijo de los Mancos	ZU2	2005	546278	4224061	30
Segura	Zumeta	Caserío Boletas	ZU3	2005	548606	4228730	1
Segura	Tus	Tramo 1	TU1	2009	540375	4239016	1
Segura	Tus	Tramo 2	TU2	2009	540136	4240803	11
Segura	Tus	Aguas abajo Aserradero	TU3	2005	543143	4245617	30
Segura	Tus	Pte. Ctra. Aserradero	TU4	2005	544192	4245905	30

Anexo II. Localidades y número de ejemplares de Trucha Común analizados para cada gen o región estudiada en la cuenca del Guadalquivir.

Cuenca	Río	Código	Capítulo III		Capítulo IV		Capítulo V			
			LDH-CI*	Microsatélites	D-loop	Microsatélites	D-loop	Cyt b	ITS1	Microsatélites
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	GU1	11	11	7	11	7	2	2	11
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	GU2	12	-	8	13	8	-	-	13
Alto Guadalquivir	Guadalquivir I	GU3	2	-	2	2	2	-	-	2
Alto Guadalquivir	Borosa	BO1	10	-	6	-	6	-	-	-
Alto Guadalquivir	Borosa	BO2	29	30	7	30	7	1	1	30
Alto Guadalquivir	Borosa	BO3	21	-	8	-	8	-	-	-
Alto Guadalquivir	Borosa	BO4	10	-	9	-	9	-	-	-
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	AG1	30	30	3	30	3	1	1	30
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	AG2	29	-	9	-	9	-	-	-
Alto Guadalquivir	Aguasmulas	AG3	27	-	8	-	8	-	-	-
Alto Guadalquivir	Guadalquivir II	GU4	27	-	5	30	5	1	-	30
Alto Guadalquivir	Guadalquivir II	GU5	23	-	6	-	6	-	-	-
Alto Guadalquivir	Aguascebas	AC1	7	7	5	7	5	-	-	7
Alto Guadalquivir	Aguascebas	AC2	27	-	5	27	5	1	-	27
Guadiana Menor	Guardal	GR1	24	25	6	25	6	1	1	25
Guadiana Menor	Castril	CS1	27	30	7	30	7	1	1	30
Guadiana Menor	Castril	CS2	28	-	8	30	8	-	-	30
Guadiana Menor	Guadalentín	GD1	30	-	6	-	6	1	1	-
Guadiana Menor	Guadalentín	GD2	29	-	5	-	5	-	-	-
Guadiana Menor	Guadalentín	GD3	29	29	5	29	5	-	-	29
Guadiana Menor	Guadalentín	GD4	30	-	7	30	7	-	-	30
Guadiana Menor	Arroyo del Pueblo	PU1	9	9	7	9	7	1	1	9
Guadiana Menor	Alhorí	AH1	2	2	1	2	1	-	-	2
Guadiana Menor	Alhorí	AH2	15	15	8	15	8	1	1	15
Guadiana Menor	Alhorí	AH3	15	18	7	18	7	-	-	18
Guadiana Menor	Fardes	FA1	27	30	7	30	7	-	-	30
Guadiana Menor	Fardes	FA2	29	-	7	29	7	1	1	29
Guadalimar	Guadalimar	GL1	5	-	3	-	3	-	-	-
Genil	Genil	GE1	14	14	5	14	5	1	1	14
Genil	Genil	GE2	17	17	3	17	3	-	-	17
Genil	Genil	GE3	25	-	8	-	8	-	-	-
Genil	Genil	GE4	27	-	8	29	8	-	-	29
Genil	Maitena	MA1	35	35	5	35	5	1	1	35
Genil	Maitena	MA2	29	-	7	-	7	-	-	-
Genil	Maitena	MA3	29	-	8	29	8	-	-	29
Genil	Aguas Blancas	AB1	28	29	6	29	6	1	1	29
Genil	Monachil	MO1	28	30	5	30	5	1	1	30
Genil	Dílar	DI1	30	30	5	30	5	1	1	30
Genil	Cacín	CA1	30	32	2	32	2	-	-	32
Genil	Cacín	CA2	13	-	6	14	6	1	1	14
Genil	Cacín	CA3	34	-	2	34	2	-	-	34
Genil	Cacín	CA4	1	-	1	1	1	-	-	1
Genil	Cacín	CA5	8	-	1	8	1	1	-	8
Genil	Cacín	CA6	1	-	1	1	1	-	-	1
Genil	Cacín	CA7	1	-	1	1	1	-	-	1
Genil	Cacín	CA8	26	-	6	28	6	1	-	28
Genil	Cacín	CA10	31	-	2	31	2	-	-	31
Genil	Cacín	CA12	19	-	6	23	6	1	1	23
Genil	Cebollón	CA9	23	24	7	24	7	-	-	24
Genil	Añales	CA11	17	19	6	19	6	-	-	19
Genil	Alhama	AL1	29	30	7	30	7	-	1	30

Anexo II (continuación). Localidades y número de ejemplares de Trucha Común analizados para cada gen o región estudiada en las cuencas del Guadalfeo, Adra, Andarax y Segura.

Cuenca	Río	Código	Capítulo III		Capítulo IV		Capítulo V			
			LDH-CI*	Microsatélites	D-loop	Microsatélites	D-loop	Cyt b	ITS1	Microsatélites
Guadalfeo	Grande de Bérchules	CB1	29	30	4	30	4	1	1	30
Guadalfeo	Grande de Bérchules	GB1	13	14	7	14	7	-	1	14
Guadalfeo	Grande de Bérchules	GB2	29	-	10	29	10	-	-	29
Guadalfeo	Trevélez	TR1	30	30	3	30	3	1	1	30
Guadalfeo	Trevélez	TR2	28	-	5	-	5	1	1	-
Guadalfeo	Trevélez	TR3	28	-	4	-	4	-	-	-
Guadalfeo	Trevélez	TR4	27	-	6	-	6	-	-	-
Guadalfeo	Poqueira	PO1	33	35	6	35	6	1	1	35
Guadalfeo	Poqueira	PO2	27	-	5	-	5	-	-	-
Guadalfeo	Poqueira	PO3	26	-	5	-	5	1	1	-
Guadalfeo	Chico de Soportújar	CH1	28	30	7	30	7	1	2	30
Guadalfeo	Chico de Soportújar	CH2	29	-	7	28	7	2	1	28
Guadalfeo	Lanjarón	LA1	28	29	9	29	9	1	1	29
Guadalfeo	Lanjarón	LA2	29	-	5	30	5	1	1	30
Guadalfeo	Torrente	TO1	33	35	9	35	9	1	1	35
Guadalfeo	Torrente	TO2	19	-	4	19	4	-	-	19
Adra	Paterna	PA1	9	9	-	-	5	-	-	9
Adra	Paterna	PA2	5	-	-	-	2	1	1	6
Adra	Bayárcal	BA1	17	18	-	-	5	-	-	18
Adra	Bayárcal	BA2	13	13	-	-	7	-	-	13
Adra	Bayárcal	BA3	28	-	-	-	4	1	-	-
Adra	Bayárcal	BA4	28	-	-	-	7	-	-	-
Adra	Mecina	ME1	27	30	-	-	8	-	-	30
Adra	Mecina	ME2	20	-	-	-	2	1	-	-
Andarax	Andarax	AN1	4	-	-	-	1	1	1	-
Andarax	Andarax	AN2	30	30	-	-	5	1	1	30
Andarax	Andarax	AN3	29	-	-	-	5	-	-	-
Andarax	Andarax	AN4	21	-	-	-	6	-	-	-
Segura	Segura	SE1	28	30	5	30	5	1	1	30
Segura	Segura	SE2	29	-	5	-	5	-	-	-
Segura	Segura	SE3	28	-	4	30	4	-	-	30
Segura	Segura	SE4	4	-	4	-	4	-	-	-
Segura	Madera	MD1	21	19	8	19	8	1	1	19
Segura	Madera	MD2	23	-	7	-	7	-	-	-
Segura	Madera	MD3	15	-	6	15	6	-	-	15
Segura	Zumeta	ZU1	29	30	6	30	6	1	1	30
Segura	Zumeta	ZU2	28	-	5	-	5	-	-	-
Segura	Zumeta	ZU3	1	-	1	-	1	-	-	-
Segura	Tus	TU1	1	1	1	1	1	-	-	1
Segura	Tus	TU2	11	11	7	11	7	1	1	11
Segura	Tus	TU3	27	-	5	29	5	1	-	29
Segura	Tus	TU4	29	-	5	-	5	1	1	-

Anexo III. Alelos detectados para los ocho loci microsatélites e interpretación de su origen para la Trucha Común en el sur de la Península Ibérica.

Str15		Str60		Str73		Ssa85	
Alelo	Origen	Alelo	Origen	Alelo	Origen	Alelo	Origen
200	Nativo	90	Nativo/Exótico	132	Nativo	102	Nativo
212	Nativo	94	Nativo/Exótico	134	Nativo	104	Exótico
214	Exótico	96	Nativo	136	Nativo	106	Nativo
218	Nativo	98	Exótico	138	Nativo	108	Nativo
220	Nativo/Exótico	104	Nativo	140	Nativo/Exótico	110	Exótico
222	Nativo			142	Nativo	112	Nativo/Exótico
224	Exótico			144	Exótico	114	Exótico
226	Nativo			146	Exótico	118	Nativo
228	Nativo			156	Nativo		

Ssa197		SSOSL417		SSOSL438		BFRO 002	
Alelo	Origen	Alelo	Origen	Alelo	Origen	Alelo	Origen
116	Nativo	167	Nativo	89	Nativo	109	Nativo
124	Nativo	171	Nativo	93	Nativo/Exótico	111	Nativo
128	Exótico	173	Nativo	97	Nativo/Exótico	113	Nativo
132	Exótico	175	Nativo/Exótico	99	Exótico	117	Nativo/Exótico
136	Exótico	177	Exótico	101	Nativo	119	Nativo
140	Exótico	181	Nativo/Exótico	103	Nativo/Exótico	121	Exótico
144	Nativo	183	Nativo/Exótico	105	Nativo/Exótico	125	Nativo
146	Nativo	187	Nativo	107	Nativo		
150	Nativo/Exótico	189	Exótico	111	Nativo/Exótico		
154	Nativo	191	Exótico	113	Nativo		
158	Nativo/Exótico	195	Nativo	119	Nativo		
162	Nativo	197	Nativo				
166	Nativo	199	Nativo				
170	Nativo	201	Nativo				
174	Nativo	203	Nativo				
		205	Nativo				
		207	Nativo				
		209	Nativo				
		211	Nativo				

Anexo IV. Valores medios de F_{ST} (bajo la diagonal) y R_{ST} (sobre la diagonal) por pares entre los ríos estudiados en la sur de la Península Ibérica. Valores de significación: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, n.s. = no significativo.

	Guadaluquivir I	Borosa	Aguasmulas	Guadaluquivir II	Aguascebas	Guardal	Castriil	Guadalentín	Ayo. del Pueblo	Alhórfi	Fardes	Gentil	Mañena	Aguas Blancas	Monachil	Dílar
Guadaluquivir I																
Borosa	0,00 n.s.	0,017 n.s.	0,057*	0,213***	0,251***	0,040 n.s.	0,138***	0,096**	0,014 n.s.	0,399***	0,0134 n.s.	0,460***	0,5676***	0,316***	-0,011 n.s.	0,567***
Aguasmulas	0,00 n.s.	0,000 n.s.	0,011 n.s.	0,211***	0,260***	0,017 n.s.	0,139***	0,047*	-0,023 n.s.	0,592***	0,027 n.s.	0,482***	0,622***	0,373***	-0,025 n.s.	0,691***
Guadaluquivir II	0,00 n.s.	0,000 n.s.		0,063*	0,100**	0,074*	0,035*	-0,003 n.s.	-0,026 n.s.	0,555***	0,091**	0,23***	0,326***	0,118**	0,031 n.s.	0,354***
Aguascebas	0,00 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.		-0,003 n.s.	0,268***	0,231***	0,037 n.s.	0,084 n.s.	0,677***	0,251***	0,044*	0,114**	0,010 n.s.	0,169***	0,128**
Guardal	0,00 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.		0,320***	0,263***	0,067*	0,125*	0,704***	0,303***	0,015 n.s.	0,032*	-0,022 n.s.	0,216***	0,057*
Castriil	0,00 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.		0,208***	0,114**	0,054 n.s.	0,494***	0,011 n.s.	0,532***	0,661***	0,427***	0,007 n.s.	0,707***
Guadalentín	0,00 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.		0,081***	0,099*	0,719***	0,132***	0,434***	0,563***	0,321***	0,093**	0,678***
Ayo. del Pueblo	0,00 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.		-0,011 n.s.	0,550***	0,142***	0,166***	0,224***	0,083**	0,063*	0,240***
Alhórfi	0,00 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.		0,613***	0,058 n.s.	0,364***	0,540***	0,222**	-0,016 n.s.	0,615***
Fardes	0,00 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.		0,276***	0,829***	0,891***	0,791***	0,390***	0,917***
Gentil	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***		0,067***	0,048*	0,018 n.s.	0,502***
Mañena	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	0,000 n.s.		0,085***	0,483***	0,243***
Aguas Blancas	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	0,000 n.s.	0,000 n.s.		0,254***	0,211***
Monachil	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	1,000***	1,000***	1,000***		0,468***
Dílar	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	
Cacín	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	0,000 n.s.
Alhama	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	1,000***	1,000***	1,000***	0,000 n.s.	1,000***
Grande de Bérchules																
Trevélez	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	1,000***	1,000***
Poqueira	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	1,000***	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	1,000***	1,000***
Chico de Soportújar																
Lanjarón	0,980***	0,986***	0,983***	0,970***	0,959**	0,963**	0,979***	0,985***	0,966***	0,977***	0,978***	0,990***	0,989***	0,975***	0,959***	0,967**
Torrente	0,711***	0,769***	0,740***	0,64***	0,577***	0,596***	0,703***	0,752***	0,612***	0,685***	0,694***	0,908***	0,906***	0,838***	0,577***	0,756***
Bayárcal	0,632***	0,706***	0,670***	0,540*	0,452 n.s.	0,478*	0,622**	0,685***	0,501*	0,598**	0,610***	0,472**	0,462**	0,250 n.s.	0,452 n.s.	0,354*
Andarax	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	1,000***	1,000***	1,000***	0,000 n.s.	1,000***
Segura	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	1,000***	1,000***	1,000***	0,000 n.s.	1,000***
Madera	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	1,000***	1,000***	1,000***	0,000 n.s.	1,000***
Zúmeda	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	1,000***	1,000***	1,000***	0,000 n.s.	1,000***
Tus	0,876***	0,901***	0,889***	0,846***	0,820***	0,827***	0,872***	0,894***	0,834***	0,865***	0,869***	0,926***	0,924***	0,880***	0,820***	0,852***

Anexo IV (continuación). Valores medios de F_{ST} (bajo la diagonal) y R_{ST} (sobre la diagonal) por pares entre los ríos estudiados en la sur de la Península Ibérica. Valores de significación: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, n.s. = no significativo.

	Cacín	Alhama	Grande de Bérchules	Trevélez	Poqueira	Chico de Sopórtujar	Lanjarón	Torrente	Bayárcal	Andarax	Segura	Madera	Zumeta	Tus
Guadalquivir I	0,347***	0,370***	0,010 n.s.	0,574***	0,589***	0,012 n.s.	0,182***	0,004 n.s.	0,153**	0,063*	0,131**	-0,010 n.s.	0,064*	0,031 n.s.
Borosa	0,298***	0,432***	0,010 n.s.	0,691***	0,704***	0,006 n.s.	0,281***	0,016 n.s.	0,126**	0,054*	0,114***	0,028 n.s.	0,163***	0,051**
Aguasulmas	0,162***	0,161***	0,062*	0,352***	0,364***	0,025 n.s.	0,355***	0,061*	0,038 n.s.	-0,003 n.s.	0,042*	0,074*	0,202***	0,043*
Guadalquivir II	0,237***	0,024 n.s.	0,177***	0,129**	0,135**	0,142 n.s.	0,505***	0,150**	-0,012 n.s.	0,038 n.s.	0,067*	0,242**	0,426***	0,270***
Aguascebas	0,269***	0,009 n.s.	0,227***	0,069*	0,074*	0,189***	0,545***	0,198***	0,006 n.s.	0,073*	0,094**	0,286***	0,469***	0,3***
Guardal	0,37***	0,469***	0,015 n.s.	0,702**	0,715***	0,033 n.s.	0,212***	0,022 n.s.	0,19***	0,109**	0,167***	0,033 n.s.	0,117***	0,126***
Castril	0,071***	0,422***	0,049**	0,678***	0,688***	0,095***	0,450***	0,097***	0,172***	0,123***	0,213***	0,196***	0,388***	0,175***
Guadalentín	0,187***	0,104**	0,109***	0,243***	0,248***	0,052*	0,398***	0,097***	0,012 n.s.	-0,001 n.s.	0,015 n.s.	0,106***	0,226***	0,074**
Ayo. del Pueblo	0,255***	0,283***	0,027 n.s.	0,623***	0,644***	-0,009 n.s.	0,314***	0,016 n.s.	0,033 n.s.	-0,015 n.s.	0,019 n.s.	0,023 n.s.	0,203**	0,015 n.s.
Alhorrí	0,737***	0,829***	0,258***	0,918***	0,922***	0,388***	0,076**	0,197***	0,596***	0,541***	0,587***	0,391***	0,504***	0,638***
Fardes	0,325***	0,357***	0,018 n.s.	0,497***	0,506***	0,034*	0,127***	0,015 n.s.	0,211***	0,099**	0,183***	0,015 n.s.	0,051*	0,074**
Genil	0,307***	0,018 n.s.	0,327***	0,068**	0,070***	0,325***	0,665***	0,303***	0,077**	0,225***	0,241***	0,479***	0,682***	0,526***
Maitena	0,383***	0,188***	0,408***	0,122**	0,135***	0,398***	0,720***	0,370***	0,124***	0,322**	0,335***	0,586***	0,803***	0,642***
Aguas Blancas	0,223***	0,073*	0,221***	0,202**	0,217***	0,216**	0,578***	0,201***	0,021 n.s.	0,113**	0,175***	0,364***	0,614***	0,418***
Monachil	0,296***	0,289***	0,019 n.s.	0,475***	0,488***	0,000 n.s.	0,205***	0,011 n.s.	0,124**	0,033 n.s.	0,081**	-0,018 n.s.	0,042 n.s.	0,001 n.s.
Dílar	0,448***	0,214***	0,387***	0,781***	0,889***	0,392***	0,712***	0,334***	0,126**	0,324***	0,310***	0,580***	0,870***	0,709***
Cacín		0,269***	0,169***	0,455***	0,458***	0,256***	0,617***	0,272***	0,265***	0,249***	0,332***	0,383***	0,476***	0,330***
Alhama	1,000***		0,242***	0,256***	0,269***	0,246***	0,607***	0,217***	0,036 n.s.	0,153***	0,155***	0,392***	0,680***	0,492***
Grande de Bérchules	1,000***	1,000***		0,394***	0,404***	0,035*	0,174***	0,012 n.s.	0,165***	0,065*	0,126***	0,006 n.s.	0,033 n.s.	0,063**
Trevélez	1,000***	1,000***	0,000 n.s.		0,002 n.s.	0,393***	0,710***	0,341***	0,129***	0,327***	0,330***	0,588***	0,873***	0,714***
Poqueira	1,000***	1,000***	0,000 n.s.	0,000 n.s.		0,402***	0,718***	0,349***	0,135***	0,339***	0,336***	0,600***	0,881***	0,724***
Chico de Sopórtujar	0,993***	0,966***	0,985***	0,987***	0,983***		0,228***	0,011 n.s.	0,103**	0,028 n.s.	0,080***	0,015***	0,073**	0,015 n.s.
Lanjarón	0,911***	0,612***	0,885***	0,897***	0,871***	0,87***		0,122***	0,453***	0,347***	0,421***	0,171***	0,175***	0,327***
Torrente	0,715***	0,501*	0,393*	0,430*	0,350*	0,861***	0,630***		0,135***	0,042*	0,094***	-0,007 n.s.	0,025 n.s.	0,052*
Bayárcal	1,000***	0,000 n.s.	1,000***	1,000***	1,000***	0,977***	0,685***	0,598**		0,008 n.s.	0,013 n.s.	0,171***	0,317***	0,169***
Andarax	1,000***	0,000 n.s.	1,000***	1,000***	1,000***	0,977***	0,685***	0,59**	0,000 n.s.		0,026 n.s.	0,082*	0,235***	0,107**
Segura	1,000***	0,000 n.s.	1,000***	1,000***	1,000***	0,979***	0,703***	0,621**	0,000 n.s.	0,000 n.s.		0,127***	0,289***	0,158***
Madera	1,000***	0,000 n.s.	1,000***	1,000***	1,000***	0,978***	0,694***	0,610**	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.		0,064*	0,075**
Zumeta	1,000***	0,000 n.s.	1,000***	1,000***	1,000***	0,974***	0,664***	0,571**	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,000 n.s.		0,183***
Tus	0,940***	0,834***	0,910***	0,917***	0,900***	0,380**	0,819***	0,814***	0,865***	0,865***	0,872***	0,869***	0,856***	

Anexo IV (continuación). Valores medios de F_{ST} (bajo la diagonal) y R_{ST} (sobre la diagonal) por pares entre las cuencas estudiadas en la sur de la Península Ibérica. Valores de significación: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, n.s. = no significativo.

	Alto Guadalquivir	Guadiana Menor	Genil	Guadalfeo	Adra	Andarax	Segura
Alto Guadalquivir		0,071***	0,093***	0,034***	0,030*	0,000 n.s.	0,042***
Guadiana Menor	0,000 n.s.		0,244***	0,002 n.s.	0,190***	0,076**	0,033***
Genil	0,706***	0,708***		0,159***	0,124***	0,174***	0,265***
Guadalfeo	0,488***	0,492***	0,111***		0,106***	0,021 n.s.	0,010*
Adra	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,603***	0,337***		0,008 n.s.	0,130***
Andarax	0,000 n.s.	0,000 n.s.	0,603***	0,337***	0,000 n.s.		0,051*
Segura	0,293***	0,297***	0,536***	0,345***	0,152 n.s.	0,152 n.s.	

Anexo V. Tasa de migración (*M*) estimada entre las localidades de la cuenca del Alto Guadalquivir y Guadiana Menor empleando el programa *MIGRATE* v.3.2.7.

Población receptora	Población migrante					
	GU1	GU2	BO2	AG1	GU4	AC2
GU1		1,423	1,706	1,277	0,189	1,029
GU2	0,548		1,238	1,423	1,327	1,173
BO2	0,686	0,935		2,881	1,012	1,361
AG1	0,521	0,344	0,607		0,595	0,653
GU4	0,724	0,649	1,468	1,000		1,062
AC2	0,601	0,346	1,590	0,501	1,483	

Población receptora	Población migrante										
	GR1	CS1	CS2	GD3	GD4	PU1	AH1	AH2	AH3	FA1	FA2
GR1		3,949	1,359	1,970	0,143	0,894	0,179	1,040	1,231	0,536	1,323
CS1	0,409		1,437	0,502	0,130	1,040	0,093	0,279	0,418	0,780	0,122
CS2	0,270	0,395		0,757	0,567	0,455	0,445	0,099	0,049	0,298	0,680
GD3	0,052	0,753	0,646		0,690	0,245	0,297	0,052	0,052	0,065	0,220
GD4	1,058	0,286	0,372	4,205		0,844	0,400	0,086	0,257	0,077	1,029
PU1	0,982	0,139	0,416	1,955	0,462		0,265	0,254	0,208	0,539	0,831
AH1	0,632	1,053	1,280	0,948	0,774	0,369		0,685	3,448	0,316	0,737
AH2	0,442	0,223	0,265	0,796	0,000	0,453	0,295		2,364	0,973	0,796
AH3	0,122	0,308	0,147	0,073	0,024	0,549	1,709	2,033		0,449	1,157
FA1	1,083	1,483	0,808	4,458	0,251	0,496	0,039	0,304	0,492		2,620
FA2	0,712	1,046	1,021	2,435	0,232	1,460	0,832	0,788	0,485	0,972	

Anexo V (continuación). Tasa de migración (*M*) estimada entre las localidades de la cuenca del Genil empleando el programa *MIGRATE* v.3.2.7.

Población migrante																						
Población receptora	GE1	GE2	GE4	MA1	MA3	AB1	MO1	DII	CA1	CA2	CA3	CA4	CA5	CA6	CA7	CA8	CA9	CA10	CA11	CA12	AL1	
GE1		0,404	1,667	1,313	1,608	0,934	0,606	0,834	1,490	1,010	0,455	0,505	0,657	0,303	0,303	0,783	0,758	1,128	1,490	0,455	0,984	
GE2	0,257		1,286	0,522	0,643	0,833	1,003	1,550	0,051	0,772	1,003	0,900	0,412	0,309	0,669	0,514	0,592	0,412	0,540	0,720	0,849	
GE4	1,419	1,186		1,694	0,847	1,617	0,466	0,614	0,727	1,419	1,136	0,381	0,169	0,657	0,360	0,657	0,551	0,635	0,678	0,805	0,826	
MA1	1,674	0,385	1,005		2,077	1,090	0,342	0,684	0,876	0,705	0,620	0,585	0,941	0,192	1,090	0,748	1,325	0,299	0,278	0,620	0,577	
MA3	0,946	0,218	0,175	0,480		0,519	0,451	1,440	0,480	0,218	0,364	0,899	0,315	0,364	0,975	0,364	0,495	0,553	0,521	0,116	0,116	
AB1	0,731	0,609	1,892	1,291	2,173		0,195	1,973	0,231	1,265	0,341	0,560	0,073	0,317	0,244	0,341	1,949	0,707	0,999	1,169	0,682	
MO1	0,233	0,108	0,467	0,467	0,467	0,363		0,593	0,162	0,054	0,180	0,362	0,359	0,718	0,162	0,162	0,269	0,180	0,862	0,611	0,557	
DII	0,383	0,191	0,478	0,893	0,937	0,207	0,351		0,670	0,574	0,810	0,096	1,279	0,478	0,207	0,797	0,605	0,542	0,989	0,749	0,255	
CA1	0,578	0,867	0,801	0,423	0,734	0,378	0,845	0,534		0,489	0,400	0,979	0,467	0,334	0,467	0,734	0,934	1,957	2,513	1,134	0,400	
CA2	0,217	0,949	0,650	0,569	1,057	0,678	0,521	0,705	0,596		1,084	1,247	1,301	0,921	0,488	0,434	2,385	0,569	0,896	1,572	0,705	
CA3	0,247	0,346	0,511	0,297	1,286	1,204	0,313	0,528	0,775	1,052		0,297	0,594	0,676	0,330	0,956	1,682	0,775	0,528	0,693	0,247	
CA4	1,244	1,134	1,244	1,281	0,439	0,878	0,732	1,207	1,464	1,500	2,817		0,439	0,695	0,687	0,622	1,263	0,183	0,799	1,281	0,622	
CA5	1,775	0,296	2,788	1,347	1,019	0,752	0,499	1,249	2,038	0,427	1,293	1,216		0,493	0,296	0,493	1,183	0,559	0,756	0,263	0,427	
CA6	0,723	0,548	1,028	0,952	0,685	0,685	0,190	0,800	1,371	0,685	2,589	1,180	1,180		1,828	1,599	0,952	0,800	0,876	0,533	1,257	
CA7	0,560	0,735	0,902	0,875	0,350	1,400	0,910	0,490	1,855	0,735	1,400	0,665	1,225	0,105		0,595	1,610	0,245	1,015	1,015	0,700	
CA8	0,586	0,812	0,113	0,879	0,586	0,338	0,045	0,248	0,383	1,240	1,717	0,338	0,211	1,827	0,541		2,147	1,511	1,285	0,631	0,450	
CA9	1,266	0,409	0,292	0,588	0,779	0,802	0,448	0,701	0,818	0,974	2,250	0,565	0,916	0,709	0,877	1,656		0,195	0,662	0,487	1,013	
CA10	0,472	1,289	1,509	1,006	1,740	1,038	0,881	1,881	1,918	0,503	0,912	0,472	0,252	1,719	1,447	0,315	1,572		0,995	0,315	2,044	
CA11	1,135	0,697	1,108	0,923	0,451	0,615	0,164	1,076	0,759	0,821	1,244	0,328	0,841	1,928	0,759	1,251	0,533	0,205		0,554	0,656	
CA12	1,457	1,059	1,550	0,786	0,581	1,435	0,410	3,998	0,478	0,935	1,242	1,025	1,025	0,615	0,683	1,743	2,973	0,820	1,504		0,957	
AL1	0,813	0,981	0,056	1,037	0,729	0,869	1,093	0,953	0,364	1,037	1,738	2,186	0,364	0,056	1,402	0,757	1,149	0,477	0,364	0,897		

Anexo V (continuación). Tasa de migración (*M*) estimada entre las localidades de la cuenca del Guadalfeo y Segura empleando el programa *MIGRATE* v.3.2.7.

Población receptora	Población migrante									
	CB1	GB2	TR1	PO1	CH1	CH2	LA1	LA2	TO1	TO2
CB1		1,088	0,977	1,220	0,355	0,244	0,894	0,267	0,489	0,527
GB2	2,736		1,734	2,714	0,444	0,684	1,292	0,479	1,292	1,334
TR1	0,434	0,567		0,709	0,551	0,184	0,234	0,117	0,050	0,317
PO1	0,189	0,269	1,501		0,443	0,497	0,347	0,331	0,411	0,505
CH1	0,866	0,458	0,534	0,884		1,686	1,069	1,070	2,010	0,593
CH2	1,050	0,879	1,244	0,485	1,858		1,076	0,484	1,722	1,399
LA1	0,188	0,314	0,522	0,502	0,356	0,369		1,839	1,086	0,084
LA2	0,652	0,271	0,018	0,609	0,816	0,380	0,327		1,114	0,543
TO1	0,346	0,768	0,154	0,921	0,404	1,094	0,480	0,364		0,441
TO2	0,454	1,521	0,887	1,189	1,388	1,796	0,400	0,107	0,720	

Población receptora	Población migrante							
	SE1	SE3	MD1	MD3	ZU2	TU1	TU2	TU3
SE1		1,284	0,904	0,762	0,423	0,593	0,833	0,325
SE3	0,922		1,308	1,400	0,905	0,990	0,563	0,307
MD1	0,994	0,852		0,428	0,497	0,473	0,888	0,426
MD3	0,895	1,682	1,442		0,852	0,197	1,879	1,177
ZU2	1,183	0,452	1,791	0,939		0,470	1,165	0,261
TU1	1,274	0,132	2,328	2,065	1,010		3,295	2,460
TU2	0,807	0,489	1,115	0,572	0,425	0,851		1,027
TU3	1,153	0,683	1,623	0,406	1,175	0,918	1,153	

Anexo VI. Origen geográfico y haplotipos empleados en los análisis filogenéticos y filogeográficos. Son incluidos como referencia los trabajos de origen y cita de las secuencias empleadas. Los fragmentos parciales para las regiones D-Loop y Cyt b son indicados por medio de asteriscos.

Especie	Linaje	Ecoregión		Haplotipo	Región	Genbank	Referencias
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID403	Costa Cantábrica y Languedoc	AD _{ADcs21b}	Dloop	-	Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID403	Costa Cantábrica y Languedoc	AD _{ADcs22}	Dloop	-	Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID413	Península Ibérica austral	AD _{S1}	Dloop	-	Este trabajo
		ID414	Península Ibérica oriental	AD _{ADcs1}	Dloop	AY836330	Cortey <i>et al.</i> 2004
		ID420	Adriático austral				Maric <i>et al.</i> 2006
		ID423	Tracia				Snoj <i>et al.</i> 2009
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID413	Península Ibérica austral	AD _{S14}	Dloop	-	Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID413	Península Ibérica austral	AD _{S15}	Dloop	-	Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID413	Península Ibérica austral	AD _{S16}	Dloop	-	Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID414	Península Ibérica oriental	AD _{ADcs14}	Dloop	AY836343	Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID414	Península Ibérica oriental	AD _{ADcs16}	Dloop	AY836345	Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID414	Península Ibérica oriental	AD _{ADcs17}	Dloop	AY836346	Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID414	Península Ibérica oriental	AD _{ADcs3}	Dloop	AY836332	Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID414	Península Ibérica oriental	AD _{ADcs4}	Dloop	AY836333	Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID414	Península Ibérica oriental	AD _{ADcs20}	Dloop	AY836349	Cortey <i>et al.</i> 2004
		ID422	Vadar				Almodóvar <i>et al.</i> n.p.
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID415	Cuencas del golfo de Venecia	AD _{AD1} *	Dloop	M97962/ M97963	Giuffra <i>et al.</i> 1994 Bernatchez 2001
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID416	Península Itálica e islas	AD _{AD}	Dloop	JQ314219	Gratton <i>et al.</i> 2007
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID416	Península Itálica e islas	AD _{ADcs15}	Dloop	AY836344	Cortey <i>et al.</i> 2004 Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID416	Península Itálica e islas	AD _{ADcs21a}	Dloop	JQ030884	Lucarda <i>et al.</i> n.p.
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID416	Península Itálica e islas	AD _{ADcs23}	Dloop	-	Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID416	Península Itálica e islas	AD _{ADcs24}	Dloop	-	Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID416	Península Itálica e islas	AD _{ADcs25}	Dloop	-	Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID416	Península Itálica e islas	AD _{S1m}	Dloop	JN807337	Querci <i>et al.</i> 2013
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID416	Península Itálica e islas	AD _{AD3}	Dloop	AY260518	Susnik <i>et al.</i> 2004
		ID419	Dalmacia				
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID419	Dalmacia	AD _{ADn}	Dloop	DQ297172	Razpet <i>et al.</i> 2007
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID419	Dalmacia	AD _{ADZA1}	Dloop	GQ357911	Kohout <i>et al.</i> n.p.
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID420	Adriático austral	AD _{AD-M1}	Dloop	DQ381566	Susnik <i>et al.</i> 2007 Snoj <i>et al.</i> 2009
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID420	Adriático austral	AD _{hap12}	Dloop	AY926570	Susnik <i>et al.</i> 2007
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID420	Adriático austral	AD _{hap17}	Dloop	DQ381569	Susnik <i>et al.</i> 2007
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID420	Adriático austral	AD _{ADcs11}	Dloop	AY836340	Cortey <i>et al.</i> 2004
		ID421	Cuencas jónicas				
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID431	Anatolia central	AD _{Splatycephalus}	Dloop	AY260514	Susnik <i>et al.</i> 2004
		ID432	Anatolia austral				
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID403	Costa Cantábrica y Languedoc	AD _{AD1} *	Cyt b	X76250	Giuffra <i>et al.</i> 1994
		ID414	Península Ibérica oriental				Susnik <i>et al.</i> 2006
		ID416	Península Itálica e islas				
		ID415	Cuencas del golfo de Venecia				
		ID420	Adriático austral				
		ID421	Cuencas jónicas				
		ID422	Vadar				
		ID423	Tracia				
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID413	Península Ibérica austral	AD _{S1c1}	Cyt b	-	Este trabajo
		ID414	Península Ibérica oriental				
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID413	Península Ibérica austral	AD _{S1c2}	Cyt b	-	Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID413	Península Ibérica austral	AD _{S1c3}	Cyt b	-	Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID413	Península Ibérica austral	AD _{S1c4}	Cyt b	-	Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID415	Cuencas del golfo de Venecia	AD _{AD3} *	Cyt b	X76251	Giuffra <i>et al.</i> 1994
		ID419	Dalmacia				Susnik <i>et al.</i> 2006
		ID420	Adriático austral				
		ID422	Vadar				
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID420	Adriático austral	AD _{AD-II} *	Cyt b	STU63892	Apostolidis <i>et al.</i> 1997
		ID421	Cuencas jónicas				
		ID423	Tracia				
		ID424	Cuencas egeas				
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID423	Tracia	AD ₇₄	Cyt b	JX960842	Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID432	Anatolia austral	AD ₈₀	Cyt b	JX960835	Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID413	Península Ibérica austral	AD _{S11-2}	ITS1	-	Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID413	Península Ibérica austral	AD _{S11-3}	ITS1	-	Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID413	Península Ibérica austral	AD _{S11-1}	ITS1	-	Este trabajo
		ID414	Península Ibérica oriental				
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID416	Península Itálica e islas	AD _{rAD1}	ITS1	AF434256	Presa <i>et al.</i> 2002
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID416	Península Itálica e islas	AD _{rAD2}	ITS1	AF434260	Presa <i>et al.</i> 2002
<i>S. trutta</i>	Adriático	ID419	Dalmacia	AD _{S.platycephalus}	ITS1	AY260508	Susnik <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID404	Europa central y occidental	AT _{EX1}	Dloop	-	Almodóvar <i>et al.</i> n.p.
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID404	Europa central y occidental	AT _{EX2}	Dloop	-	Almodóvar <i>et al.</i> n.p.
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID404	Europa central y occidental	AT _{EX3}	Dloop	-	Almodóvar <i>et al.</i> n.p.
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID404	Europa central y occidental	AT _{EX4}	Dloop	-	Almodóvar <i>et al.</i> n.p.
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{ATcs32}	Dloop	EF530494	Cortey <i>et al.</i> 2009

Anexo VI (continuación). Origen geográfico y haplotipos empleados en los análisis filogenéticos y filogeográficos. Son incluidos como referencia los trabajos de origen y cita de las secuencias empleadas. Los fragmentos parciales para las regiones D-Loop y Cyt b son indicados por medio de asteriscos.

Especie	Linaje	Ecoregión	Haplotipo	Región	Genbank	Referencias
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{NI} 23	Dloop	- Cortey <i>et al.</i> 2009
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{SA} 5	Dloop	EF530487 Almodóvar <i>et al.</i> n.p.
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{NI} 10	Dloop	- Cortey <i>et al.</i> 2009
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID501	Africa atlántica noroccidental		Dloop	EF530487 Almodóvar <i>et al.</i> n.p.
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID416	Península Itálica e islas	AT _{ATSc}	Dloop	- Cortey <i>et al.</i> 2009
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID501	Africa atlántica noroccidental	AT _{ATM4}	Dloop	EF530487 Almodóvar <i>et al.</i> n.p.
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID501	Africa atlántica noroccidental	AT _{ATM5}	Dloop	- Cortey <i>et al.</i> 2009
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID404	Europa central y occidental	AT ₇₇	Cyt b	EF530495 Snoj <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID404	Europa central y occidental	AT _{EXc} 1	Cyt b	- Almodóvar <i>et al.</i> n.p.
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID404	Europa central y occidental	AT _{EXc} 2	Cyt b	- Snoj <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID404	Europa central y occidental	AT _{EXc} 3	Cyt b	- Snoj <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID404	Europa central y occidental	AT _{EXc} 4	Cyt b	- Snoj <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{Nlc} 2	Cyt b	- Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{Nlc} 1	Cyt b	- Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{SAc} 1	Cyt b	- Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{AT1} *	Cyt b	- Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID416	Península Itálica e islas			X76254 Giuffra <i>et al.</i> 1994
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID501	Africa atlántica noroccidental			
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{AT2} *	Cyt b	X76254 Giuffra <i>et al.</i> 1994
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID416	Península Itálica e islas			
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID501	Africa atlántica noroccidental			
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{NI} 1	ITS1	- Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{rAT1}	ITS1	AF434221 Presa <i>et al.</i> 2002
<i>S. trutta</i>	Atlántico	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{SAi} 1	ITS1	- Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Danubio	ID417	Danubio	DA _{DA1a}	Dloop	AY185568 Duffner <i>et al.</i> 2003
<i>S. trutta</i>	Danubio	ID418	Dniester y bajo Danubio			
<i>S. trutta</i>	Danubio	ID434	Kura y cuencas australes cáspicas	DA _{Iran1}	Dloop	HM237337 Vera <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Danubio	ID417	Danubio	DA ₇₈	Cyt b	JX960837 Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>S. trutta</i>	Danubio	ID418	Dniester y bajo Danubio			
<i>S. trutta</i>	Danubio	ID417	Danubio	DA _{rDA}	ITS1	AF434277 Presa <i>et al.</i> 2002
<i>S. trutta</i>	Danubio	ID418	Dniester y bajo Danubio			
<i>S. trutta</i>	Duero	ID422	Vadar			
<i>S. trutta</i>	Duero	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{DU} 1	Dloop	- Almodóvar <i>et al.</i> n.p.
<i>S. trutta</i>	Duero	ID412	Península Ibérica occidental		Dloop	EF530513 Cortey <i>et al.</i> 2009
<i>S. trutta</i>	Duero	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{DUcs18}	Dloop	EF530530 Cortey <i>et al.</i> 2009
<i>S. trutta</i>	Duero	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{DUc} 1	Cyt b	- Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Duero	ID412	Península Ibérica occidental	AT _{DUi} 1	ITS1	- Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Marmoratus	ID419	Dalmacia	MA _{rMA1}	Dloop	AY836365 Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Marmoratus	ID419	Dalmacia	MA _{rMA2}	Dloop	JN208022 Pujolar <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Marmoratus	ID419	Dalmacia	MA _{rMA1}	Cyt b	JX960838 Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>S. trutta</i>	Marmoratus	ID419	Dalmacia	MA _{rMA1}	ITS1	AF434229 Presa <i>et al.</i> 2002
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID403	Costa Cantábrica y Languedoc	ME _{MEcs17}	Dloop	- Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID403	Costa Cantábrica y Languedoc	ME _{MEcs18}	Dloop	- Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID403	Costa Cantábrica y Languedoc	ME _{MEcs19}	Dloop	- Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID403	Costa Cantábrica y Languedoc	ME _{MEcs20}	Dloop	- Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID403	Costa Cantábrica y Languedoc	ME _{MEcs21}	Dloop	- Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID403	Costa Cantábrica y Languedoc	ME _{MEcs15}	Dloop	AY836364 Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID414	Península Ibérica oriental			Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID403	Costa Cantábrica y Languedoc	ME _{MI} 1	Dloop	- Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID413	Península Ibérica austral	ME _{MEcs1}		AY836350 Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID414	Península Ibérica oriental			Snoj <i>et al.</i> 2009
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID416	Península Itálica e islas			Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID420	Adriático austral			
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID413	Península Ibérica austral	ME _{MI} 2	Dloop	- Este trabajo
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID414	Península Ibérica oriental	ME _{MEcs10}	Dloop	AY836359 Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID414	Península Ibérica oriental	ME _{MEcs11}	Dloop	AY836360 Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID414	Península Ibérica oriental	ME _{MEcs12}	Dloop	AY836361 Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID414	Península Ibérica oriental	ME _{MEcs5}	Dloop	AY836354 Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID414	Península Ibérica oriental	ME _{MEcs6}	Dloop	AY836355 Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID414	Península Ibérica oriental	ME _{MEcs7}	Dloop	AY836356 Cortey <i>et al.</i> 2004
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID416	Península Itálica e islas	ME _{MEcs22}	Dloop	- Reynaud <i>et al.</i> 2011
<i>S. trutta</i>	Mediterráneo	ID416	Península Itálica e islas	ME _{MEcs23}	Dloop	- Reynaud <i>et al.</i> 2011

Anexo VI (continuación). Origen geográfico y haplotipos empleados en los análisis filogenéticos y filogeográficos. Son incluidos como referencia los trabajos de origen y cita de las secuencias empleadas. Los fragmentos parciales para las regiones D-Loop y Cyt b son indicados por medio de asteriscos.

Especie	Linaje	Ecoregión	Haplotipo	Región	Genbank	Referencias
<i>S. trutta</i>	<i>Mediterráneo</i>	ID403 Costa Cantábrica y Languedoc	ME _{Mic} 1	Cyt b	-	Este trabajo
		ID413 Península Ibérica austral			JX960839	Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
		ID414 Península Ibérica oriental				
		ID420 Adriático austral				
<i>S. trutta</i>	<i>Mediterráneo</i>	ID413 Península Ibérica austral	ME _{Mic} 2	Cyt b	-	Este trabajo
<i>S. trutta</i>	<i>Mediterráneo</i>	ID403 Costa Cantábrica y Languedoc	ME _{rME2}	ITS1	AF434253	Presa <i>et al.</i> 2002
		ID413 Península Ibérica austral				
<i>S. trutta</i>	<i>Mediterráneo</i>	ID413 Península Ibérica austral	ME _{Mic} 2	ITS1	-	Este trabajo
<i>S. trutta</i>	<i>Mediterráneo</i>	ID413 Península Ibérica austral	ME _{Mic} 3	ITS1	-	Este trabajo
<i>S. trutta</i>	<i>Mediterráneo</i>	ID413 Península Ibérica austral	ME _{Mic} 1	ITS1	-	Este trabajo
		ID414 Península Ibérica oriental				
<i>S. trutta</i>	<i>Mediterráneo</i>	ID414 Península Ibérica oriental	ME _{rME1}	ITS1	AF434217	Presa <i>et al.</i> 2002
		ID415 Cuencas del golfo de Venecia				
<i>S. trutta</i>	<i>Mediterráneo</i>	ID421 Cuencas Jónicas	ME _{rME3}	ITS1	AF434250	Presa <i>et al.</i> 2002
<i>S. trutta</i>	-	ID420 Adriático austral	68	ITS1	AF434259	Presa <i>et al.</i> 2002
<i>S. trutta</i>	-	ID403 Costa Cantábrica y Languedoc	50	ITS1	AF434255	Presa <i>et al.</i> 2002
<i>S. trutta</i>	-	ID412 Península Ibérica occidental	71	ITS1	AF434244	Presa <i>et al.</i> 2002
		ID423 Tracia				
<i>S. trutta</i>	-	ID414 Península Ibérica oriental	rMEDA	ITS1	AF434237	Presa <i>et al.</i> 2002
		ID419 Dalmacia				
<i>S. trutta</i>	-	ID501 Africa atlántica noroccidental	37a	ITS1	AF434201	Presa <i>et al.</i> 2002
<i>S. obtusirostris</i>	-	ID419 Dalmacia	<i>S. obtusirostris</i>	Dloop	EF469832	Snoj <i>et al.</i> 2008
<i>S. obtusirostris</i>	-	ID419 Dalmacia	<i>S. obtusirostris</i>	Dloop	EF469833	Snoj <i>et al.</i> 2008
<i>S. obtusirostris</i>	-	ID419 Dalmacia	<i>S. obtusirostris</i>	Cyt b	JX960841	Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>S. obtusirostris</i>	-	ID419 Dalmacia	<i>S. obtusirostris</i>	ITS	AY260509	Susnik <i>et al.</i> 2004
<i>S. ohridanus</i>	-	ID420 Adriático austral	<i>S. ohridanus</i>	Dloop	AY926564	Susnik <i>et al.</i> 2006
<i>S. ohridanus</i>	-	ID420 Adriático austral	<i>S. ohridanus</i>	Dloop	AY926563	Susnik <i>et al.</i> 2006
<i>S. ohridanus</i>	-	ID420 Adriático austral	<i>S. ohridanus</i>	Cyt b	JX960763	Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>S. ohridanus</i>	-	ID420 Adriático austral	<i>S. ohridanus</i>	Cyt b	JX960764	Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>S. ohridanus</i>	-	ID420 Adriático austral	<i>S. ohridanus</i>	ITS1	AF201313	Phillips <i>et al.</i> 2000
<i>S. salar</i>	-	- Vertiente Atlántica	<i>S. salar</i>	Dloop	GQ376151	Machado-Schiaffino <i>et al.</i> n.p.
<i>S. salar</i>	-	- Vertiente Atlántica	<i>S. salar</i>	Dloop	GQ376148	Machado-Schiaffino <i>et al.</i> n.p.
<i>S. salar</i>	-	- Vertiente Atlántica	<i>S. salar</i>	Cyt b	JX960834	Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>S. salar</i>	-	- Vertiente Atlántica	<i>S. salar</i>	Cyt b	JX960833	Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>S. salar</i>	-	- Vertiente Atlántica	<i>S. salar</i>	ITS1	AF518876	Presa <i>et al.</i> 2002
<i>S. salar</i>	-	- Vertiente Atlántica	<i>S. salar</i>	ITS1	AF201312	Phillips <i>et al.</i> 2000
<i>O. gorbuscha</i>	-	- Vertiente del Pacífico	<i>O. gorbuscha</i>	Dloop	EF455489	Lee <i>et al.</i> n.p.
<i>O. gorbuscha</i>	-	- Vertiente del Pacífico	<i>O. gorbuscha</i>	Cyt b	JX960806	Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>O. gorbuscha</i>	-	- Vertiente del Pacífico	<i>O. gorbuscha</i>	ITS1	AF170535	Domanico <i>et al.</i> 1997
<i>O. keta</i>	-	- Vertiente del Pacífico	<i>O. keta</i>	Dloop	AP010773	Garvin <i>et al.</i> 2010
<i>O. keta</i>	-	- Vertiente del Pacífico	<i>O. keta</i>	Cyt b	JX960808	Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>O. keta</i>	-	- Vertiente del Pacífico	<i>O. keta</i>	ITS1	AF097562	Domanico <i>et al.</i> 1997
<i>O. masou</i>	-	- Vertiente del Pacífico	<i>O. masou</i>	Dloop	DQ864465	Chang <i>et al.</i> n.p.
<i>O. masou</i>	-	- Vertiente del Pacífico	<i>O. masou</i>	Cyt b	JX960812	Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>O. masou</i>	-	- Vertiente del Pacífico	<i>O. masou</i>	ITS1	AF170536	Domanico <i>et al.</i> 1997
<i>O. nerka</i>	-	- Vertiente del Pacífico	<i>O. nerka</i>	Dloop	EF055889	Hsieh <i>et al.</i> n.p.
<i>O. nerka</i>	-	- Vertiente del Pacífico	<i>O. nerka</i>	Cyt b	JX960816	Crête-Lafrenière <i>et al.</i> 2012
<i>O. nerka</i>	-	- Vertiente del Pacífico	<i>O. nerka</i>	ITS1	AF097561	Domanico <i>et al.</i> 1997

Anexo VII. Valores medios de divergencia genética (en porcentaje de cambios) para la región D-Loop corregidos mediante el modelo GTR entre los haplotipos empleados en los análisis filogenéticos.

	AD _{Sl} 1	AD _{Sl} 4	AD _{Sl} 5	AD _{Sl} 6	AD _{ADcs} 3	AD _{ADcs} 4	AD _{ADcs} 11	AD _{ADcs} 14	AD _{ADcs} 15	AD _{ADcs} 16	AD _{ADcs} 17	AD _{ADcs} 20	AD _{ADcs} 21a	AD _{ADcs} 21b	AD _{ADcs} 22
AD _{Sl} 1															
AD _{Sl} 4	0,20														
AD _{Sl} 5	0,10	0,10													
AD _{Sl} 6	0,10	0,31	0,20												
AD _{ADcs} 3	0,10	0,31	0,20	0,20											
AD _{ADcs} 4	0,10	0,31	0,20	0,20	0,20										
AD _{ADcs} 11	0,10	0,31	0,20	0,20	0,20	0,20									
AD _{ADcs} 14	0,10	0,31	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20								
AD _{ADcs} 15	0,20	0,41	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,10							
AD _{ADcs} 16	0,31	0,51	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,51						
AD _{ADcs} 17	0,20	0,41	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,41	0,10					
AD _{ADcs} 20	0,10	0,31	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,31	0,41	0,31				
AD _{ADcs} 21a	0,31	0,51	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,31	0,62	0,51	0,20			
AD _{ADcs} 21b	0,10	0,31	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,31	0,41	0,31	0,20	0,41		
AD _{ADcs} 22	0,20	0,41	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,41	0,51	0,41	0,31	0,51	0,10	
AD _{ADcs} 23	0,72	0,94	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,72	0,83	0,72	0,83	0,83	0,83	0,94
AD _{ADcs} 24	0,83	1,04	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,83	0,94	0,83	0,94	0,94	0,94	1,04
AD _{ADcs} 25	0,72	0,94	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,72	1,04	0,94	0,83	0,83	0,83	0,94
AD _{AD}	0,31	0,51	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,51	0,62	0,51	0,20	0,41	0,41	0,51
AD _{AD3}	0,20	0,41	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,20	0,51	0,41	0,31	0,31	0,31	0,41
AD _{Stm}	0,31	0,51	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,51	0,62	0,51	0,20	0,41	0,41	0,51
AD _{AdN}	0,31	0,51	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,20	0,31	0,41	0,31	0,41	0,62	0,41	0,51
AD _{AD-M1}	0,31	0,51	0,41	0,41	0,41	0,41	0,20	0,41	0,51	0,41	0,31	0,41	0,62	0,41	0,51
AD _{hap12}	0,10	0,31	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,31	0,41	0,31	0,20	0,41	0,20	0,31
AD _{hap17}	0,20	0,41	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,41	0,51	0,41	0,31	0,51	0,31	0,41
AD _{AdZAI}	0,41	0,62	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,62	0,72	0,62	0,51	0,72	0,51	0,62
AD _{Splatycephalus}	0,20	0,41	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,41	0,51	0,41	0,31	0,51	0,31	0,41
AT _{EX1}	0,72	0,94	0,83	0,83	0,62	0,83	0,83	0,83	0,94	0,72	0,83	0,83	1,04	0,83	0,94
AT _{EX2}	0,62	0,83	0,72	0,72	0,51	0,72	0,72	0,72	0,83	0,62	0,72	0,72	0,94	0,72	0,83
AT _{EX3}	0,83	1,04	0,94	0,94	0,72	0,83	0,94	0,94	1,04	0,83	0,94	0,94	1,15	0,94	1,04
AT _{EX4}	0,72	0,94	0,83	0,83	0,62	0,83	0,83	0,83	0,94	0,72	0,83	0,83	1,04	0,83	0,94
AT _{SA5}	1,04	1,26	1,15	1,15	0,94	1,15	1,15	1,15	1,26	1,04	1,15	0,94	1,15	0,94	1,04
AT _{ATcs32}	1,04	1,26	1,15	1,15	0,94	1,15	1,15	1,15	1,26	1,04	1,15	0,94	1,15	1,15	1,26
AT _{NI23}	0,72	0,94	0,83	0,83	0,62	0,83	0,83	0,83	0,94	0,72	0,83	0,62	0,83	0,83	0,94
AT _{NI10}	1,15	1,37	1,26	1,26	1,04	1,26	1,26	1,26	1,37	1,15	1,26	1,04	1,26	1,26	1,37
AT _{ATM4}	1,26	1,48	1,37	1,37	1,15	1,37	1,37	1,37	1,48	1,26	1,37	1,15	1,37	1,37	1,48
AT _{ATM5}	1,26	1,48	1,37	1,37	1,15	1,37	1,37	1,37	1,48	1,26	1,37	1,15	1,37	1,37	1,48
AT _{ATSc}	1,04	1,26	1,15	1,15	0,94	1,15	1,15	1,15	1,26	1,04	1,15	1,15	1,37	1,15	1,26
DA _{Iran1}	1,04	1,26	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,26	1,15	1,15	1,15	1,37	1,15	1,26
DA _{DA1a}	1,04	1,26	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,26	1,15	1,15	1,15	1,37	1,15	1,26
AT _{DU1}	0,83	1,04	0,94	0,72	0,72	0,94	0,94	0,94	1,04	0,83	0,94	0,94	1,15	0,94	1,04
AT _{DUes18}	0,94	1,15	1,04	0,83	0,83	1,04	1,04	1,04	1,15	0,94	1,04	1,04	1,26	1,04	1,15
<i>S. marmoratus</i> 1	0,41	0,62	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,62	0,62	0,51	0,51	0,72	0,51	0,62
<i>S. marmoratus</i> 2	0,41	0,62	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,62	0,62	0,51	0,51	0,72	0,51	0,62
ME _{ME1}	0,51	0,72	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,72	0,72	0,62	0,41	0,62	0,62	0,72
ME _{ME2}	0,41	0,62	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,62	0,62	0,51	0,51	0,72	0,51	0,62
ME _{MEes5}	0,62	0,62	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,83	0,83	0,72	0,51	0,72	0,72	0,83
ME _{MEes6}	0,51	0,72	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,72	0,72	0,62	0,41	0,62	0,62	0,72
ME _{MEes7}	0,72	0,94	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,94	0,94	0,83	0,62	0,83	0,83	0,94
ME _{MEes10}	0,62	0,83	0,72	0,72	0,72	0,72	0,62	0,72	0,83	0,83	0,72	0,51	0,72	0,72	0,83
ME _{MEes11}	0,41	0,62	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,62	0,62	0,51	0,31	0,51	0,51	0,62
ME _{MEes12}	0,51	0,51	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,72	0,72	0,62	0,41	0,62	0,62	0,72
ME _{MEes15}	0,62	0,83	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,83	0,83	0,72	0,51	0,72	0,72	0,83
ME _{MEes17}	0,51	0,72	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,72	0,72	0,62	0,41	0,62	0,62	0,72
ME _{MEes18}	0,62	0,83	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,83	0,83	0,72	0,51	0,72	0,72	0,83
ME _{MEes19}	0,62	0,83	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,83	0,83	0,72	0,51	0,72	0,62	0,72
ME _{MEes20}	0,51	0,72	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,72	0,72	0,62	0,41	0,62	0,62	0,72
ME _{MEes21}	0,62	0,83	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,83	0,83	0,72	0,51	0,72	0,72	0,83
ME _{MEes22}	0,41	0,62	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,62	0,62	0,51	0,51	0,72	0,51	0,62
ME _{MEes23}	0,31	0,51	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,51	0,51	0,41	0,41	0,62	0,41	0,51
<i>O. gorbuscha</i>	17,41	17,91	17,66	17,66	17,66	17,16	17,66	17,66	17,91	17,16	17,16	17,41	17,91	17,65	17,41
<i>O. keta</i>	10,78	10,78	10,60	10,97	10,97	10,78	10,97	10,59	10,78	10,60	10,59	10,78	11,16	10,97	11,15
<i>O. masau</i>	18,14	18,66	18,40	18,40	18,40	18,40	18,40	17,89	18,14	17,89	17,89	18,39	18,91	18,39	18,64
<i>O. nerka</i>	13,08	13,08	12,88	13,29	13,29	13,29	13,29	12,88	13,08	12,88	12,88	13,29	13,71	13,29	13,08
<i>S. salar</i> 1	6,69	6,99	6,84	6,84	6,84	6,84	6,84	6,54	6,69	6,68	6,68	6,83	7,14	6,83	6,68
<i>S. salar</i> 2	6,36	6,65	6,50	6,50	6,21	6,51	6,50	6,21	6,36	6,51	6,50	6,50	6,80	6,50	6,35
<i>S. obtusirostris</i> 1	1,15	1,37	1,26	1,26	1,04	1,26	1,26	1,26	1,37	1,37	1,26	1,26	1,48	1,26	1,37
<i>S. obtusirostris</i> 2	1,15	1,37	1,26	1,26	1,04	1,26	1,26	1,26	1,37	1,37	1,26	1,26	1,48	1,26	1,37
<i>S. ohridanus</i> 1	2,05	2,28	2,16	2,16	2,16	2,16	2,16	2,16	2,28	2,05	2,16	2,16	2,39	2,16	2,28
<i>S. ohridanus</i> 2	2,16	2,39	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,39	2,16	2,28	2,28	2,51	2,28	2,39

Anexo VII (continuación). Valores medios de divergencia genética (en porcentaje de cambios) para la región D-Loop corregidos mediante el modelo GTR entre los haplotipos empleados en los análisis filogenéticos.

	AD _{Dec23}	AD _{Dec24}	AD _{Dec25}	AD ₁₀	AD ₀₃	AD ₀₄	AD ₀₅	AD ₀₆	AD ₀₇	AD ₀₈	AD ₀₉	AD ₁₀	AD ₁₁	AD ₁₂	AD ₁₃	AD ₁₄	AD ₁₅	AD ₁₆	AD ₁₇	AD ₁₈	AD ₁₉	AD ₂₀	AD ₂₁	AD ₂₂	AD ₂₃	AD ₂₄	AD ₂₅	AD ₂₆	AD ₂₇	AD ₂₈	AD ₂₉	AD ₃₀	AD ₃₁	AD ₃₂	AD ₃₃	AD ₃₄	AD ₃₅	AD ₃₆	AD ₃₇	AD ₃₈	AD ₃₉	AD ₄₀	AD ₄₁	AD ₄₂	AD ₄₃	AD ₄₄	AD ₄₅	AD ₄₆	AD ₄₇	AD ₄₈	AD ₄₉	AD ₅₀	AD ₅₁	AD ₅₂	AD ₅₃	AD ₅₄	AD ₅₅	AD ₅₆	AD ₅₇	AD ₅₈	AD ₅₉	AD ₆₀	AD ₆₁	AD ₆₂	AD ₆₃	AD ₆₄	AD ₆₅	AD ₆₆	AD ₆₇	AD ₆₈	AD ₆₉	AD ₇₀	AD ₇₁	AD ₇₂	AD ₇₃	AD ₇₄	AD ₇₅	AD ₇₆	AD ₇₇	AD ₇₈	AD ₇₉	AD ₈₀	AD ₈₁	AD ₈₂	AD ₈₃	AD ₈₄	AD ₈₅	AD ₈₆	AD ₈₇	AD ₈₈	AD ₈₉	AD ₉₀	AD ₉₁	AD ₉₂	AD ₉₃	AD ₉₄	AD ₉₅	AD ₉₆	AD ₉₇	AD ₉₈	AD ₉₉	AD ₁₀₀	AD ₁₀₁	AD ₁₀₂	AD ₁₀₃	AD ₁₀₄	AD ₁₀₅	AD ₁₀₆	AD ₁₀₇	AD ₁₀₈	AD ₁₀₉	AD ₁₁₀	AD ₁₁₁	AD ₁₁₂	AD ₁₁₃	AD ₁₁₄	AD ₁₁₅	AD ₁₁₆	AD ₁₁₇	AD ₁₁₈	AD ₁₁₉	AD ₁₂₀	AD ₁₂₁	AD ₁₂₂	AD ₁₂₃	AD ₁₂₄	AD ₁₂₅	AD ₁₂₆	AD ₁₂₇	AD ₁₂₈	AD ₁₂₉	AD ₁₃₀	AD ₁₃₁	AD ₁₃₂	AD ₁₃₃	AD ₁₃₄	AD ₁₃₅	AD ₁₃₆	AD ₁₃₇	AD ₁₃₈	AD ₁₃₉	AD ₁₄₀	AD ₁₄₁	AD ₁₄₂	AD ₁₄₃	AD ₁₄₄	AD ₁₄₅	AD ₁₄₆	AD ₁₄₇	AD ₁₄₈	AD ₁₄₉	AD ₁₅₀	AD ₁₅₁	AD ₁₅₂	AD ₁₅₃	AD ₁₅₄	AD ₁₅₅	AD ₁₅₆	AD ₁₅₇	AD ₁₅₈	AD ₁₅₉	AD ₁₆₀	AD ₁₆₁	AD ₁₆₂	AD ₁₆₃	AD ₁₆₄	AD ₁₆₅	AD ₁₆₆	AD ₁₆₇	AD ₁₆₈	AD ₁₆₉	AD ₁₇₀	AD ₁₇₁	AD ₁₇₂	AD ₁₇₃	AD ₁₇₄	AD ₁₇₅	AD ₁₇₆	AD ₁₇₇	AD ₁₇₈	AD ₁₇₉	AD ₁₈₀	AD ₁₈₁	AD ₁₈₂	AD ₁₈₃	AD ₁₈₄	AD ₁₈₅	AD ₁₈₆	AD ₁₈₇	AD ₁₈₈	AD ₁₈₉	AD ₁₉₀	AD ₁₉₁	AD ₁₉₂	AD ₁₉₃	AD ₁₉₄	AD ₁₉₅	AD ₁₉₆	AD ₁₉₇	AD ₁₉₈	AD ₁₉₉	AD ₂₀₀	AD ₂₀₁	AD ₂₀₂	AD ₂₀₃	AD ₂₀₄	AD ₂₀₅	AD ₂₀₆	AD ₂₀₇	AD ₂₀₈	AD ₂₀₉	AD ₂₁₀	AD ₂₁₁	AD ₂₁₂	AD ₂₁₃	AD ₂₁₄	AD ₂₁₅	AD ₂₁₆	AD ₂₁₇	AD ₂₁₈	AD ₂₁₉	AD ₂₂₀	AD ₂₂₁	AD ₂₂₂	AD ₂₂₃	AD ₂₂₄	AD ₂₂₅	AD ₂₂₆	AD ₂₂₇	AD ₂₂₈	AD ₂₂₉	AD ₂₃₀	AD ₂₃₁	AD ₂₃₂	AD ₂₃₃	AD ₂₃₄	AD ₂₃₅	AD ₂₃₆	AD ₂₃₇	AD ₂₃₈	AD ₂₃₉	AD ₂₄₀	AD ₂₄₁	AD ₂₄₂	AD ₂₄₃	AD ₂₄₄	AD ₂₄₅	AD ₂₄₆	AD ₂₄₇	AD ₂₄₈	AD ₂₄₉	AD ₂₅₀	AD ₂₅₁	AD ₂₅₂	AD ₂₅₃	AD ₂₅₄	AD ₂₅₅	AD ₂₅₆	AD ₂₅₇	AD ₂₅₈	AD ₂₅₉	AD ₂₆₀	AD ₂₆₁	AD ₂₆₂	AD ₂₆₃	AD ₂₆₄	AD ₂₆₅	AD ₂₆₆	AD ₂₆₇	AD ₂₆₈	AD ₂₆₉	AD ₂₇₀	AD ₂₇₁	AD ₂₇₂	AD ₂₇₃	AD ₂₇₄	AD ₂₇₅	AD ₂₇₆	AD ₂₇₇	AD ₂₇₈	AD ₂₇₉	AD ₂₈₀	AD ₂₈₁	AD ₂₈₂	AD ₂₈₃	AD ₂₈₄	AD ₂₈₅	AD ₂₈₆	AD ₂₈₇	AD ₂₈₈	AD ₂₈₉	AD ₂₉₀	AD ₂₉₁	AD ₂₉₂	AD ₂₉₃	AD ₂₉₄	AD ₂₉₅	AD ₂₉₆	AD ₂₉₇	AD ₂₉₈	AD ₂₉₉	AD ₃₀₀	AD ₃₀₁	AD ₃₀₂	AD ₃₀₃	AD ₃₀₄	AD ₃₀₅	AD ₃₀₆	AD ₃₀₇	AD ₃₀₈	AD ₃₀₉	AD ₃₁₀	AD ₃₁₁	AD ₃₁₂	AD ₃₁₃	AD ₃₁₄	AD ₃₁₅	AD ₃₁₆	AD ₃₁₇	AD ₃₁₈	AD ₃₁₉	AD ₃₂₀	AD ₃₂₁	AD ₃₂₂	AD ₃₂₃	AD ₃₂₄	AD ₃₂₅	AD ₃₂₆	AD ₃₂₇	AD ₃₂₈	AD ₃₂₉	AD ₃₃₀	AD ₃₃₁	AD ₃₃₂	AD ₃₃₃	AD ₃₃₄	AD ₃₃₅	AD ₃₃₆	AD ₃₃₇	AD ₃₃₈	AD ₃₃₉	AD ₃₄₀	AD ₃₄₁	AD ₃₄₂	AD ₃₄₃	AD ₃₄₄	AD ₃₄₅	AD ₃₄₆	AD ₃₄₇	AD ₃₄₈	AD ₃₄₉	AD ₃₅₀	AD ₃₅₁	AD ₃₅₂	AD ₃₅₃	AD ₃₅₄	AD ₃₅₅	AD ₃₅₆	AD ₃₅₇	AD ₃₅₈	AD ₃₅₉	AD ₃₆₀	AD ₃₆₁	AD ₃₆₂	AD ₃₆₃	AD ₃₆₄	AD ₃₆₅	AD ₃₆₆	AD ₃₆₇	AD ₃₆₈	AD ₃₆₉	AD ₃₇₀	AD ₃₇₁	AD ₃₇₂	AD ₃₇₃	AD ₃₇₄	AD ₃₇₅	AD ₃₇₆	AD ₃₇₇	AD ₃₇₈	AD ₃₇₉	AD ₃₈₀	AD ₃₈₁	AD ₃₈₂	AD ₃₈₃	AD ₃₈₄	AD ₃₈₅	AD ₃₈₆	AD ₃₈₇	AD ₃₈₈	AD ₃₈₉	AD ₃₉₀	AD ₃₉₁	AD ₃₉₂	AD ₃₉₃	AD ₃₉₄	AD ₃₉₅	AD ₃₉₆	AD ₃₉₇	AD ₃₉₈	AD ₃₉₉	AD ₄₀₀	AD ₄₀₁	AD ₄₀₂	AD ₄₀₃	AD ₄₀₄	AD ₄₀₅	AD ₄₀₆	AD ₄₀₇	AD ₄₀₈	AD ₄₀₉	AD ₄₁₀	AD ₄₁₁	AD ₄₁₂	AD ₄₁₃	AD ₄₁₄	AD ₄₁₅	AD ₄₁₆	AD ₄₁₇	AD ₄₁₈	AD ₄₁₉	AD ₄₂₀	AD ₄₂₁	AD ₄₂₂	AD ₄₂₃	AD ₄₂₄	AD ₄₂₅	AD ₄₂₆	AD ₄₂₇	AD ₄₂₈	AD ₄₂₉	AD ₄₃₀	AD ₄₃₁	AD ₄₃₂	AD ₄₃₃	AD ₄₃₄	AD ₄₃₅	AD ₄₃₆	AD ₄₃₇	AD ₄₃₈	AD ₄₃₉	AD ₄₄₀	AD ₄₄₁	AD ₄₄₂	AD ₄₄₃	AD ₄₄₄	AD ₄₄₅	AD ₄₄₆	AD ₄₄₇	AD ₄₄₈	AD ₄₄₉	AD ₄₅₀	AD ₄₅₁	AD ₄₅₂	AD ₄₅₃	AD ₄₅₄	AD ₄₅₅	AD ₄₅₆	AD ₄₅₇	AD ₄₅₈	AD ₄₅₉	AD ₄₆₀	AD ₄₆₁	AD ₄₆₂	AD ₄₆₃	AD ₄₆₄	AD ₄₆₅	AD ₄₆₆	AD ₄₆₇	AD ₄₆₈	AD ₄₆₉	AD ₄₇₀	AD ₄₇₁	AD ₄₇₂	AD ₄₇₃	AD ₄₇₄	AD ₄₇₅	AD ₄₇₆	AD ₄₇₇	AD ₄₇₈	AD ₄₇₉	AD ₄₈₀	AD ₄₈₁	AD ₄₈₂	AD ₄₈₃	AD ₄₈₄	AD ₄₈₅	AD ₄₈₆	AD ₄₈₇	AD ₄₈₈	AD ₄₈₉	AD ₄₉₀	AD ₄₉₁	AD ₄₉₂	AD ₄₉₃	AD ₄₉₄	AD ₄₉₅	AD ₄₉₆	AD ₄₉₇	AD ₄₉₈	AD ₄₉₉	AD ₅₀₀	AD ₅₀₁	AD ₅₀₂	AD ₅₀₃	AD ₅₀₄	AD ₅₀₅	AD ₅₀₆	AD ₅₀₇	AD ₅₀₈	AD ₅₀₉	AD ₅₁₀	AD ₅₁₁	AD ₅₁₂	AD ₅₁₃	AD ₅₁₄	AD ₅₁₅	AD ₅₁₆	AD ₅₁₇	AD ₅₁₈	AD ₅₁₉	AD ₅₂₀	AD ₅₂₁	AD ₅₂₂	AD ₅₂₃	AD ₅₂₄	AD ₅₂₅	AD ₅₂₆	AD ₅₂₇	AD ₅₂₈	AD ₅₂₉	AD ₅₃₀	AD ₅₃₁	AD ₅₃₂	AD ₅₃₃	AD ₅₃₄	AD ₅₃₅	AD ₅₃₆	AD ₅₃₇	AD ₅₃₈	AD ₅₃₉	AD ₅₄₀	AD ₅₄₁	AD ₅₄₂	AD ₅₄₃	AD ₅₄₄	AD ₅₄₅	AD ₅₄₆	AD ₅₄₇	AD ₅₄₈	AD ₅₄₉	AD ₅₅₀	AD ₅₅₁	AD ₅₅₂	AD ₅₅₃	AD ₅₅₄	AD ₅₅₅	AD ₅₅₆	AD ₅₅₇	AD ₅₅₈	AD ₅₅₉	AD ₅₆₀	AD ₅₆₁	AD ₅₆₂	AD ₅₆₃	AD ₅₆₄	AD ₅₆₅	AD ₅₆₆	AD ₅₆₇	AD ₅₆₈	AD ₅₆₉	AD ₅₇₀	AD ₅₇₁	AD ₅₇₂	AD ₅₇₃	AD ₅₇₄	AD ₅₇₅	AD ₅₇₆	AD ₅₇₇	AD ₅₇₈	AD ₅₇₉	AD ₅₈₀	AD ₅₈₁	AD ₅₈₂	AD ₅₈₃	AD ₅₈₄	AD ₅₈₅	AD ₅₈₆	AD ₅₈₇	AD ₅₈₈	AD ₅₈₉	AD ₅₉₀	AD ₅₉₁	AD ₅₉₂	AD ₅₉₃	AD ₅₉₄	AD ₅₉₅	AD ₅₉₆	AD ₅₉₇	AD ₅₉₈	AD ₅₉₉	AD ₆₀₀	AD ₆₀₁	AD ₆₀₂	AD ₆₀₃	AD ₆₀₄	AD ₆₀₅	AD ₆₀₆	AD ₆₀₇	AD ₆₀₈	AD ₆₀₉	AD ₆₁₀	AD ₆₁₁	AD ₆₁₂	AD ₆₁₃	AD ₆₁₄	AD ₆₁₅	AD ₆₁₆	AD ₆₁₇	AD ₆₁₈	AD ₆₁₉	AD ₆₂₀	AD ₆₂₁	AD ₆₂₂	AD ₆₂₃	AD ₆₂₄	AD ₆₂₅	AD ₆₂₆	AD ₆₂₇	AD ₆₂₈	AD ₆₂₉	AD ₆₃₀	AD ₆₃₁	AD ₆₃₂	AD ₆₃₃	AD ₆₃₄	AD ₆₃₅	AD ₆₃₆	AD ₆₃₇	AD ₆₃₈	AD ₆₃₉	AD ₆₄₀	AD ₆₄₁	AD ₆₄₂	AD ₆₄₃	AD ₆₄₄	AD ₆₄₅	AD ₆₄₆	AD ₆₄₇	AD ₆₄₈	AD ₆₄₉	AD ₆₅₀	AD ₆₅₁	AD ₆₅₂	AD ₆₅₃	AD ₆₅₄	AD ₆₅₅	AD ₆₅₆	AD ₆₅₇	AD ₆₅₈	AD ₆₅₉	AD ₆₆₀	AD ₆₆₁	AD ₆₆₂	AD ₆₆₃	AD ₆₆₄	AD ₆₆₅	AD ₆₆₆	AD ₆₆₇	AD ₆₆₈	AD ₆₆₉	AD ₆₇₀	AD ₆₇₁	AD ₆₇₂	AD ₆₇₃	AD ₆₇₄	AD ₆₇₅	AD ₆₇₆	AD ₆₇₇	AD ₆₇₈	AD ₆₇₉	AD ₆₈₀	AD ₆₈₁	AD ₆₈₂	AD ₆₈₃	AD ₆₈₄	AD ₆₈₅	AD ₆₈₆	AD ₆₈₇	AD ₆₈₈	AD ₆₈₉	AD ₆₉₀	AD ₆₉₁	AD ₆₉₂	AD ₆₉₃	AD ₆₉₄	AD ₆₉₅	AD ₆₉₆	AD ₆₉₇	AD ₆₉₈	AD ₆₉₉	AD ₇₀₀	AD ₇₀₁	AD ₇₀₂	AD ₇₀₃	AD ₇₀₄	AD ₇₀₅	AD ₇₀₆	AD ₇₀₇	AD ₇₀₈	AD ₇₀₉	AD ₇₁₀	AD ₇₁₁	AD ₇₁₂	AD ₇₁₃	AD ₇₁₄	AD ₇₁₅	AD ₇₁₆	AD ₇₁₇	AD ₇₁₈	AD ₇₁₉	AD ₇₂₀	AD ₇₂₁	AD ₇₂₂	AD ₇₂₃	AD ₇₂₄	AD ₇₂₅	AD ₇₂₆	AD ₇₂₇	AD ₇₂₈	AD ₇₂₉	AD ₇₃₀	AD ₇₃₁	AD ₇₃₂	AD ₇₃₃	AD ₇₃₄	AD ₇₃₅	AD ₇₃₆	AD ₇₃₇	AD ₇₃₈	AD ₇₃₉	AD ₇₄₀	AD ₇₄₁	AD ₇₄₂	AD ₇₄₃	AD ₇₄₄	AD ₇₄₅	AD ₇₄₆	AD ₇₄₇	AD ₇₄₈	AD ₇₄₉	AD ₇₅₀	AD ₇₅₁	AD ₇₅₂	AD ₇₅₃	AD ₇₅₄	AD ₇₅₅	AD ₇₅₆	AD ₇₅₇	AD ₇₅₈	AD ₇₅₉	AD ₇₆₀	AD ₇₆₁	AD ₇₆₂	AD ₇₆₃	AD ₇₆₄	AD ₇₆₅	AD ₇₆₆	AD ₇₆₇	AD ₇₆₈	AD ₇₆₉	AD ₇₇₀	AD ₇₇₁	AD ₇₇₂	AD ₇₇₃	AD ₇₇₄	AD ₇₇₅	AD ₇₇₆	AD ₇₇₇	AD ₇₇₈	AD ₇₇₉	AD ₇₈₀	AD ₇₈₁	AD ₇₈₂	AD ₇₈₃	AD ₇₈₄	AD ₇₈₅	AD ₇₈₆	AD ₇₈₇	AD ₇₈₈	AD ₇₈₉	AD ₇₉₀	AD ₇₉₁	AD ₇₉₂	AD ₇₉₃	AD ₇₉₄	AD ₇₉₅	AD ₇₉₆	AD ₇₉₇	AD ₇₉₈	AD ₇₉₉	AD ₈₀₀	AD ₈₀₁	AD ₈₀₂	AD ₈₀₃	AD ₈₀₄	AD ₈₀₅	AD ₈₀₆	AD ₈₀₇	AD ₈₀₈	AD ₈₀₉	AD ₈₁₀	AD ₈₁₁	AD ₈₁₂	AD ₈₁₃	AD ₈₁₄	AD ₈₁₅	AD ₈₁₆	AD ₈₁₇	AD ₈₁₈	AD ₈₁₉	AD ₈₂₀	AD ₈₂₁	AD ₈₂₂	AD ₈₂₃	AD ₈₂₄	AD ₈₂₅	AD ₈₂₆	AD ₈₂₇	AD ₈₂₈	AD ₈₂₉	AD ₈₃₀	AD ₈₃₁	AD ₈₃₂	AD ₈₃₃	AD ₈₃₄	AD ₈₃₅	AD ₈₃₆	AD ₈₃₇	AD ₈₃₈	AD ₈₃₉	AD ₈₄₀	AD ₈₄₁	AD ₈₄₂	AD ₈₄₃	AD ₈₄₄	AD ₈₄₅	AD ₈₄₆	AD ₈₄₇	AD ₈₄₈	AD ₈₄₉	AD ₈₅₀	AD ₈₅₁	AD ₈₅₂	AD ₈₅₃	AD ₈₅₄	AD ₈₅₅	AD ₈₅₆	AD ₈₅₇	AD ₈₅₈	AD ₈₅₉	AD ₈₆₀	AD ₈₆₁	AD ₈₆₂	AD ₈₆₃	AD ₈₆₄	AD ₈₆₅	AD ₈₆₆	AD ₈₆₇	AD ₈₆₈	AD ₈₆₉	AD ₈₇₀	AD ₈₇₁	AD ₈₇₂	AD ₈₇₃	AD ₈₇₄	AD ₈₇₅	AD ₈₇₆	AD ₈₇₇	AD ₈₇₈	AD ₈₇₉	AD ₈₈₀	AD ₈₈₁ </
--	---------------------	---------------------	---------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	----------------------

Anexo VII (continuación). Valores medios de divergencia genética (en porcentaje de cambios) para la región D-Loop corregidos mediante el modelo GTR entre los haplotipos empleados en los análisis filogenéticos.

	AT _{DU1}	AT _{DUcs18}	MA _{MAcs1}	MA _{MAcs2}	ME _{MEc1}	ME _{MEc2}	ME _{MEcs5}	ME _{MEcs6}	ME _{MEcs7}	ME _{MEcs10}	ME _{MEcs11}	ME _{MEcs12}	ME _{MEcs15}
AT _{DU1}													
AT _{DUcs18}	0,10												
<i>S. marmoratus</i> 1	1,15	1,26											
<i>S. marmoratus</i> 2	1,04	1,15	0,10										
ME _{MEc1}	1,15	1,26	0,83	0,72									
ME _{MEc2}	1,04	1,15	0,72	0,62	0,10								
ME _{MEcs5}	1,26	1,37	0,94	0,83	0,10	0,20							
ME _{MEcs6}	1,15	1,26	0,83	0,72	0,20	0,31	0,31						
ME _{MEcs7}	1,37	1,48	1,04	0,94	0,20	0,31	0,31	0,41					
ME _{MEcs10}	1,26	1,37	0,94	0,83	0,10	0,20	0,20	0,31	0,31				
ME _{MEcs11}	1,04	1,15	0,72	0,62	0,10	0,20	0,20	0,31	0,31	0,20			
ME _{MEcs12}	1,15	1,26	0,83	0,72	0,20	0,31	0,10	0,41	0,41	0,31	0,10		
ME _{MEcs15}	1,04	1,15	0,94	0,83	0,10	0,20	0,20	0,31	0,31	0,20	0,20	0,31	
ME _{MEcs17}	1,15	1,26	0,83	0,72	0,00	0,10	0,10	0,20	0,20	0,10	0,10	0,20	0,10
ME _{MEcs18}	1,26	1,37	0,94	0,83	0,10	0,20	0,20	0,31	0,31	0,20	0,20	0,31	0,20
ME _{MEcs19}	1,26	1,37	0,94	0,83	0,10	0,20	0,20	0,31	0,31	0,20	0,20	0,31	0,20
ME _{MEcs20}	1,15	1,26	0,62	0,51	0,41	0,51	0,51	0,62	0,62	0,51	0,31	0,41	0,51
ME _{MEcs21}	1,26	1,37	0,94	0,83	0,10	0,20	0,20	0,31	0,31	0,20	0,20	0,31	0,20
ME _{MEcs22}	1,04	1,15	0,72	0,62	0,51	0,41	0,62	0,72	0,72	0,62	0,41	0,51	0,62
ME _{MEcs23}	0,94	1,04	0,62	0,51	0,41	0,31	0,51	0,62	0,62	0,51	0,31	0,41	0,51
<i>O. gorbuscha</i>	17,65	17,40	17,40	17,16	17,41	17,41	17,66	17,40	17,66	17,65	17,66	17,91	17,16
<i>O. keta</i>	11,15	10,96	10,41	10,59	11,35	11,35	11,54	11,35	11,54	11,54	11,16	11,35	11,16
<i>O. masau</i>	18,91	18,65	17,88	17,63	18,39	18,14	18,65	18,38	18,64	18,64	18,13	18,39	18,65
<i>O. nerka</i>	13,28	13,08	12,67	12,47	13,29	13,08	13,50	13,28	13,49	13,49	13,08	13,29	13,08
<i>S. salar</i> 1	7,29	7,44	6,39	6,53	6,98	6,83	7,14	6,98	7,13	7,13	6,83	6,98	7,14
<i>S. salar</i> 2	6,65	6,80	6,36	6,50	6,65	6,50	6,80	6,65	6,80	6,79	6,50	6,65	6,80
<i>S. obtusirostris</i> 1	1,37	1,48	1,26	1,15	1,48	1,37	1,59	1,48	1,48	1,59	1,37	1,48	1,59
<i>S. obtusirostris</i> 2	1,37	1,48	1,26	1,15	1,48	1,37	1,59	1,48	1,59	1,59	1,37	1,48	1,59
<i>S. ohridanus</i> 1	2,51	2,63	2,39	2,28	2,39	2,28	2,51	2,39	2,51	2,51	2,28	2,39	2,51
<i>S. ohridanus</i> 2	2,39	2,51	2,51	2,39	2,51	2,39	2,63	2,51	2,63	2,63	2,39	2,51	2,39

	ME _{MEcs17}	ME _{MEcs18}	ME _{MEcs19}	ME _{MEcs20}	ME _{MEcs21}	ME _{MEcs22}	ME _{MEcs23}	<i>O. gorbuscha</i>	<i>O. keta</i>	<i>O. masau</i>	<i>O. nerka</i>	<i>S. salar</i> 1	<i>S. salar</i> 2
ME _{MEcs17}													
ME _{MEcs18}	0,10												
ME _{MEcs19}	0,10	0,20											
ME _{MEcs20}	0,41	0,51	0,51										
ME _{MEcs21}	0,10	0,20	0,20	0,51									
ME _{MEcs22}	0,51	0,62	0,62	0,51	0,62								
ME _{MEcs23}	0,41	0,51	0,51	0,41	0,51	0,10							
<i>O. gorbuscha</i>	17,43	17,66	17,66	17,90	17,66	17,39	17,16						
<i>O. keta</i>	11,36	11,54	11,54	10,96	11,55	10,96	10,78	9,35					
<i>O. masau</i>	18,41	18,64	18,65	18,13	18,65	18,64	18,39	13,81	9,70				
<i>O. nerka</i>	13,30	13,49	13,50	13,28	13,50	13,08	12,88	7,50	5,81	9,66			
<i>S. salar</i> 1	6,99	7,14	7,14	6,83	7,14	7,13	6,98	19,21	12,84	17,60	13,02		
<i>S. salar</i> 2	6,65	6,80	6,80	6,65	6,80	6,80	6,65	19,10	13,62	17,27	13,16	1,28	
<i>S. obtusirostris</i> 1	1,48	1,59	1,59	1,26	1,59	1,37	1,26	17,97	11,56	17,70	14,18	7,00	6,67
<i>S. obtusirostris</i> 2	1,48	1,59	1,59	1,26	1,59	1,37	1,26	17,70	11,37	17,44	13,96	6,85	6,52
<i>S. ohridanus</i> 1	2,39	2,51	2,51	2,16	2,51	2,28	2,16	17,71	11,56	16,98	14,16	6,98	6,22
<i>S. ohridanus</i> 2	2,51	2,63	2,63	2,28	2,63	2,39	2,28	17,43	11,35	17,44	13,93	7,13	6,36

	<i>S. obtusirostris</i> 1	<i>S. obtusirostris</i> 2	<i>S. ohridanus</i> 1	<i>S. ohridanus</i> 2
<i>S. obtusirostris</i> 1				
<i>S. obtusirostris</i> 2	0,31			
<i>S. ohridanus</i> 1	2,40	2,40		
<i>S. ohridanus</i> 2	2,51	2,51	0,10	

Anexo VII (continuación). Valores medios de divergencia genética (en porcentaje de cambios) para el gen Cyt b corregidos mediante el modelo GTR entre los haplotipos empleados en los análisis filogenéticos.

	AD _{Sic1}	AD _{Sic2}	AD _{Sic3}	AD _{Sic4}	AD _{AD1}	AD _{AD3}	AD _{AD11}	AD _{AD80}	AD _{AD74}	AT _{Exc1}	AT _{Exc2}	AT _{Exc3}	AT _{Exc4}	AT _{Nc1}	AT _{Nc2}	AT _{Sac1}	AT ₇₇	DA ₇₈	AT _{Dic1}	S. marmoratus 1	ME _{Nic1}	ME _{Nic2}
AD _{Sic1}																						
AD _{Sic2}	0,09																					
AD _{Sic3}	0,09	0,18																				
AD _{Sic4}	0,09	0,18	0,18																			
AD _{AD1}	0,00	0,00	0,00	0,00																		
AD _{AD3}	0,27	0,27	0,18	0,27	0,27																	
AD _{AD11}	0,09	0,09	0,18	0,09	0,09	0,18																
AD _{AD80}	0,45	0,54	0,54	0,54	0,18	0,27	0,09															
AD _{AD74}	0,36	0,45	0,45	0,45	0,18	0,27	0,09	0,27														
AT _{Exc1}	1,03	1,13	1,13	1,13	1,04	1,34	1,13	1,54	1,43													
AT _{Exc2}	1,13	1,23	1,23	1,23	0,93	1,23	1,03	1,23	1,13	0,45												
AT _{Exc3}	1,13	1,23	1,23	1,23	1,03	1,34	1,13	1,43	1,33	0,27	0,36											
AT _{Exc4}	0,93	1,03	1,03	1,03	0,94	1,24	1,04	1,43	1,33	0,09	0,36	0,18										
AT _{Nc1}	1,13	1,23	1,23	1,23	1,03	1,34	1,13	1,43	1,33	0,50	0,36	0,27	0,07									
AT _{Nc2}	1,03	1,13	1,13	1,13	1,04	1,13	1,04	1,13	1,23	0,54	0,64	0,64	0,45	0,64								
AT _{Sic1}	1,03	1,13	1,13	1,13	1,04	1,13	0,93	1,33	1,23	0,54	0,64	0,64	0,45	0,64	0,18							
AT ₇₇	1,03	1,13	1,13	1,13	0,83	1,13	0,93	1,13	1,03	0,36	0,09	0,27	0,27	0,40	0,54	0,54						
DA ₇₈	1,13	1,03	1,23	1,23	1,04	1,14	0,94	1,43	1,33	1,64	1,75	1,54	1,54	1,75	1,43	1,43	1,64					
AT _{Dic1}	1,23	1,33	1,33	1,33	1,03	1,13	0,93	1,13	1,03	1,33	1,03	1,23	1,23	1,23	1,13	1,13	0,93	1,86				
S. marmoratus 1	0,64	0,73	0,73	0,73	0,65	0,74	0,55	0,93	0,83	1,13	1,23	1,23	1,03	1,43	1,13	1,13	1,33	1,54	0,73			
ME _{Nic1}	0,83	0,93	0,73	0,93	0,84	0,75	0,75	1,13	1,03	1,33	1,43	1,43	1,23	1,43	1,13	1,13	1,33	1,23	1,54	0,18		
ME _{Nic2}	0,93	1,03	0,83	1,03	0,94	0,84	0,84	1,23	1,13	1,54	1,64	1,64	1,43	1,68	1,33	1,33	1,54	1,43	1,75	0,93	0,18	
O. keta	35,58	36,12	36,11	36,12	34,87	36,48	35,40	36,13	35,58	36,11	34,52	35,57	35,56	37,57	36,65	36,65	35,05	40,69	40,06	41,91	41,28	41,90
O. masau	31,62	32,11	31,14	31,14	30,45	30,92	30,92	32,61	32,10	32,59	30,66	32,10	32,09	32,20	32,09	33,08	31,14	36,20	33,10	32,09	34,61	35,14
O. nerka	38,31	38,89	37,75	38,89	37,57	38,14	38,14	38,90	38,32	35,54	32,97	35,02	35,01	35,12	36,08	36,08	33,47	40,03	36,10	37,18	36,62	37,17
S. salar 1	9,03	8,83	8,83	8,83	8,32	8,51	8,51	9,22	9,03	9,03	8,09	8,83	8,83	8,83	8,83	9,22	8,27	9,22	8,65	9,61	8,83	9,22
S. salar 2	9,42	9,22	9,22	9,22	8,70	8,89	8,89	9,62	9,42	9,42	8,46	9,22	9,22	9,22	9,22	9,62	8,65	10,02	9,03	10,02	9,22	9,62
S. ohridanus 1	58,67	57,83	57,82	57,83	56,00	53,59	55,18	57,85	56,17	62,16	59,53	61,28	61,25	61,28	58,64	59,50	58,67	58,60	57,83	62,16	58,63	57,79
S. ohridanus 2	55,42	54,63	54,62	54,63	52,87	50,59	52,09	54,65	53,06	58,73	56,24	57,89	57,87	57,89	54,60	56,21	55,43	56,99	54,63	57,04	55,39	54,58
S. obustrostris	2,30	2,42	2,42	2,42	2,20	2,31	2,09	2,42	2,30	2,42	2,30	2,30	2,30	2,19	2,19	2,19	2,19	2,77	1,97	2,19	2,65	2,65

	O. gorbuscha	O. keta	O. masau	O. nerka	S. salar 1	S. salar 2	S. ohridanus 1	S. ohridanus 2	S. obustrostris
O. gorbuscha									
O. keta	7,20								
O. masau	26,21	22,36							
O. nerka	14,37	14,89	21,99						
S. salar 1	40,10	36,66	35,70	32,97					
S. salar 2	40,12	36,68	36,25	32,00	0,54				
S. ohridanus 1	60,21	64,73	62,25	57,58	52,22	51,49			
S. ohridanus 2	60,29	61,16	54,68	57,64	48,63	3,38			
S. obustrostris	38,93	34,53	34,64	32,48	9,82	10,23	53,84		

Anexo VII (continuación). Valores medios de divergencia genética (en porcentaje de cambios) para la región ITS1 corregidos mediante el modelo GTR entre los haplotipos empleados en los análisis filogenéticos.

	AD _{Si1}	AD _{Si2}	AD _{Si3}	AD _{AD1}	AD _{AD2}	AD _{Spatycephalus}	AT _{N1}	AT _{Su1}	AT _{FAT1}	DA _{DA}	AT _{Du1}	MA _{MA1}	ME _{Nu1}	ME _{ME1}	ME _{ME2}	ME _{ME3}	rMEDA	37a	68	71	50
AD _{Si1}																					
AD _{Si2}	0,18																				
AD _{Si3}	0,18	0,35																			
AD _{AD1}	0,35	0,53	0,18																		
AD _{AD2}	0,53	0,71	0,35	0,18																	
AD _{Spatycephalus}	0,91	0,91	0,73	0,91	0,73																
AT _{N1}	1,07	0,89	1,25	1,44	1,25	0,36															
AT _{Su1}	0,18	0,35	0,35	0,53	0,71	1,10	0,89														
AT _{FAT1}	0,53	0,71	0,71	0,89	0,71	0,36	0,53	0,71													
DA _{DA}	0,18	0,35	0,35	0,53	0,71	1,10	1,25	0,35	0,71												
AT _{Du1}	0,00	0,18	0,18	0,35	0,53	0,91	1,07	0,18	0,53	0,18											
MA _{MA1}	0,18	0,35	0,35	0,53	0,71	1,10	1,25	0,35	0,71	0,35	0,18										
ME _{Nu1}	0,89	0,71	1,07	1,25	1,07	0,53	0,53	1,44	0,71	1,44	1,26	1,44									
ME _{ME1}	1,25	1,07	1,07	1,25	1,07	0,18	0,36	1,26	0,89	1,25	1,07	1,25	0,18								
ME _{ME2}	1,07	0,89	0,89	1,07	0,89	0,36	0,71	1,26	0,89	1,25	1,07	1,25	0,53	0,35							
ME _{ME3}	0,89	1,07	0,71	0,89	0,71	0,36	0,89	1,07	0,35	1,07	0,89	1,07	0,71	0,53	0,35						
ME _{ME1}	0,71	0,89	0,53	0,71	0,53	0,54	1,07	0,89	0,53	0,89	0,71	0,89	0,53	0,18	0,18						
ME _{ME2}	0,53	0,71	0,35	0,53	0,71	0,72	1,25	0,71	0,71	0,71	0,53	0,71	0,53	0,35	0,18	0,53					
ME _{ME3}	0,00	0,18	0,18	0,35	0,53	0,91	1,07	0,18	0,53	0,18	0,00	0,18	0,89	1,25	1,07	0,89	0,71				
rMEDA	1,07	0,71	0,89	1,07	0,89	0,54	0,89	1,07	0,53	1,25	1,07	1,25	1,26	1,07	1,07	0,53	0,71	1,07			
37a	0,18	0,35	0,35	0,53	0,71	1,10	1,25	0,35	0,71	0,35	0,18	0,35	0,71	0,53	0,35	0,18	1,25	0,89	0,89	0,35	
71	0,53	0,71	0,71	0,89	0,71	0,72	0,89	0,71	0,35	0,71	0,53	0,71	0,35	0,18	0,35	0,18	1,25	0,89	0,89	0,35	
50	0,71	0,89	0,53	0,35	0,18	0,91	1,44	0,89	0,89	0,71	0,89	1,25	1,25	1,07	0,89	0,71	0,89	0,71	1,07	0,89	0,35
O. gorbuscha	22,09	21,74	21,74	22,05	22,40	18,42	22,75	22,13	22,40	21,70	21,78	22,39	22,44	22,45	22,09	22,40	21,69	22,75	22,75	22,39	22,39
O. keta	19,19	18,85	18,86	19,15	19,48	22,71	19,14	19,22	18,81	18,82	18,89	19,48	19,51	18,85	19,18	18,81	19,14	19,14	19,14	19,48	19,47
O. masau	22,81	22,46	22,46	22,77	23,13	1,10	23,48	22,85	23,13	22,41	22,50	23,12	23,17	23,17	22,81	23,12	22,76	23,49	23,48	23,12	23,12
O. nerka	18,59	18,26	18,27	18,56	18,88	18,59	19,20	18,62	18,87	18,23	18,30	18,88	18,91	18,91	18,58	18,88	18,56	19,20	19,22	18,88	18,87
S. salar 1	1,62	1,81	1,81	2,00	2,01	0,73	1,82	1,62	1,63	1,07	1,81	1,81	1,81	2,00	1,44	1,62	1,62	2,00	2,01	1,44	1,44
S. salar 2	1,82	2,01	2,01	2,20	2,01	0,73	1,82	1,82	1,26	2,01	1,63	2,01	2,01	2,20	1,63	1,82	1,82	2,20	2,01	1,63	1,63
S. obustrostris	0,18	0,18	0,37	0,55	0,73	0,91	1,09	0,36	0,73	0,36	0,18	0,36	0,91	1,28	1,09	1,10	0,91	1,29	0,91	0,36	0,72
S. ohridanus	0,89	1,07	1,07	1,25	1,44	21,99	1,62	1,07	1,44	1,07	0,89	1,07	1,44	1,62	1,81	1,62	1,44	2,00	1,62	1,07	1,44

	O. gorbuscha	O. keta	O. masau	O. nerka	S. salar 1	S. salar 2	S. obustrostris	S. ohridanus
O. gorbuscha								
O. keta	4,32							
O. masau	6,42	5,88						
O. nerka	4,13	3,10	4,76					
S. salar 1	23,53	19,83	24,29	19,94				
S. salar 2	23,57	19,87	24,33	19,99	0,89			
S. obustrostris	21,99	19,26	22,71	18,42	1,10	1,29		
S. ohridanus	23,55	20,57	24,30	19,97	2,38	2,59	0,37	

Anexo VIII. Tiempo de divergencia en millones de años e inferencia del área ancestral para cada nodo descrito en las Figuras V.8 y V.9 empleando el programa *RASP v2.1*.

Linaje <i>Adriático</i>			Linaje <i>Mediterráneo</i>		
Nodo	Edad	Área ancestral	Nodo	Edad	Área ancestral
55	0,114 [0,000,0,381]	A	33	0,117 [0,000,1,050]	A
56	0,137 [0,002,0,464]	A	34	0,392 [0,013,3,602]	A
57	0,115 [0,000,0,379]	A	35	0,373 [0,000,1,486]	B
58	0,363 [0,057,1,284]	A	36	0,371 [0,000,3,900]	B
59	0,374 [0,241,0,611]	A	37	1,502 [0,012,8,218]	AB
60	0,532 [0,525,0,525]	A	38	0,659 [0,100,0,625]	D
61	1,450 [1,450,1,450]	AE	39	0,446 [0,000,4,785]	D
62	1,802 [1,806,1,806]	E	40	1,856 [0,002,8,572]	DE
63	0,185 [0,000,0,727]	A	41	4,906 [1,353,9,699]	BDE / ABDE / ADE / BD / ABD
64	0,160 [0,010,0,538]	A	42	0,175 [0,000,2,270]	A
65	0,238 [0,234,0,234]	AB	43	0,440 [0,103,3,393]	AB
66	0,174 [0,001,0,698]	A	44	1,208 [0,114,7,607]	A
67	0,259 [0,259,0,259]	AB / A	45	0,775 [0,000,7,920]	B
68	0,168 [0,000,0,628]	I	46	0,228 [0,002,3,718]	B
69	0,581 [0,016,1,690]	BI	47	0,581 [0,000,3,222]	B
70	0,340 [0,340,0,340]	ABI / AB / B	48	0,133 [0,000,1,248]	C
71	0,248 [0,000,0,628]	BJ	49	0,241 [0,000,1,389]	C
72	0,674 [0,016,1,690]	B	50	0,133 [0,000,1,112]	C
73	1,012 [1,012,1,012]	AB	51	0,136 [0,000,1,110]	C
74	0,464 [0,003,0,811]	AB	52	0,513 [0,180,1,493]	C
75	0,462 [0,002,1,225]	GH	53	0,730 [0,000,2,565]	C
76	1,120 [0,100,2,662]	G	54	1,740 [0,000,3,298]	BC
77	1,154 [1,153,1,153]	ABG / BG	55	0,115 [0,000,1,237]	C
78	1,245 [1,245,1,245]	B	56	0,153 [0,000,0,284]	C
79	0,460 [0,000,1,138]	G	57	0,083 [0,000,0,446]	C
80	1,391 [0,008,1,931]	G	58	0,331 [0,000,0,446]	C
81	1,801 [1,801,1,801]	BG	59	0,408 [0,000,1,288]	C
82	2,151 [2,143,2,143]	BEG / BE	60	0,625 [0,000,3,306]	C
83	0,531 [0,000,1,520]	B	61	2,402 [0,000,6,096]	C
84	1,941 [0,095,2,042]	B	62	4,307 [2,047,9,809]	AC
85	2,961 [2,814,3,500]	B	63	10,991 [10,132,12,041]	ACDE / BCDE / ABCD / ABDE
86	0,250 [0,000,0,655]	A			
87	0,392 [0,015,1,125]	A			
88	0,931 [0,071,2,070]	A			
89	0,321 [0,000,1,314]	A			
90	3,625 [2,662,4,627]	A			
91	0,138 [0,000,0,469]	C			
92	0,626 [0,045,1,236]	BC			
93	1,018 [0,092,2,386]	C			
94	4,433 [4,106,5,640]	AC			
95	0,606 [0,002,1,592]	DF			
96	2,269 [0,299,5,028]	D			
97	3,196 [0,555,6,352]	D			
98	5,692 [5,688,5,688]	ACD / CD / AD			
99	6,184 [6,024,7,784]	ABD / BCD / ABCD / BD / AB / BC / ABC			
100	0,317 [0,000,1,104]	D			
101	6,198 [6,024,7,784]	BCD / ABCD / ACD / D / ABD			
102	1,360 [0,000,3,799]	J			
103	6,975 [6,033,9,083]	ABDF / DF / BCDF / ACDF / ACF / ABF / ABCF / BCF			
104	8,156 [5,690,11,530]	ABDF / ABCF / BCDF / ACDF / ABF / F / BCF / ACF			
105	0,683 [0,000,1,724]	D			
106	3,293 [0,668,6,684]	D			
107	11,402 [10,497,12,397]	ACDF / BCDF / ABDF / ABCD / DF			



VARIABILIDAD GENÉTICA Y FILOGEOGRAFÍA DE LA TRUCHA COMÚN
***SALMO TRUTTA* EN EL SUR DE LA PENÍNSULA IBÉRICA**

Departamento de Zoología y Antropología Física. Facultad de Ciencias Biológicas. UCM

Tesis Doctoral

M^a Shaila Leal García